

コナダニ類由来炭化水素およびギ酸エステルの 生合成に関する研究

2020

森山太介

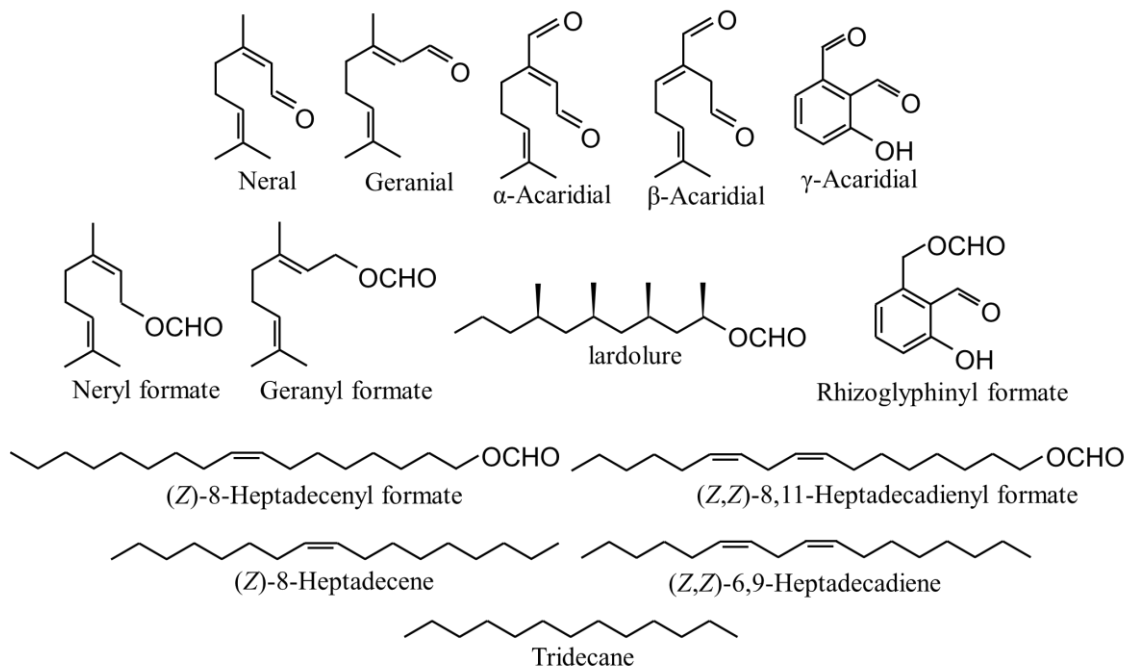
目次

緒論.....	1
第1章 サトウダニ <i>Carpoglyphus lactis</i> の炭化水素合成酵素	4
緒言	4
材料と方法	6
結果	9
考察	14
第2章 ネダニモドキ属ダニ <i>Sancassania</i> sp. Sasagawa のギ酸エステル合 成酵素	16
緒言	16
材料と方法	19
結果	21
考察	24
第3章 コナダニ類の警報フェロモン neryl formate の生合成経路	26
緒言	26
材料と方法	29
結果	30
考察	34
総合考察	36
謝辞	39
参考文献	40

1 緒論

昆虫では、コミュニケーションに利用される化学物質の構造解析や、生理活性についての研究が盛んに行われている。コミュニケーションに使われるフェロモンはいずれも、生物個体から体外に分泌され、同種の個体に一定の行動や発育過程のような特異な反応を引き起こす。特有の行動を示すフェロモンは化学受容器で受容され、性フェロモン、集合フェロモン、警報フェロモンなど様々な種類が知られている。近年では性フェロモンの種の特異性、低濃度で作用する性質を利用して、交信かく乱による害虫防除が一部行われている。交信かく乱剤は安全かつ特定の種を選択的に防除できるので、環境負荷の低減につながる。

同じ節足動物である無気門亜目ダニ（コナダニ）のフェロモン研究は進展しており分泌物の知見が数多く報告されている。コナダニ類の腹部後方には一対の後胴体部腺が存在し、その分泌物として炭化水素、モノテルペンなど様々な化合物が同定されている（Kuwahara, 2004、図 I）。今から 45 年前にケナガコナダニの警報フェロモンとしてモノテルペンのギ酸エステル neryl formate が同定された（Kuwahara *et al.*, 1975）。Neryl formate はケナガコナダニ以外に *Tyrobolus lini*（Kuwahara, 2004）、*Histiogaster rotundus*（Hiraoka *et al.*, 2003）、*Rhizoglyphus robini*、*Rhizoglyphus etosus*、*Rhizoglyphus* sp. Oki、*Rhizoglyphus* sp. Mori（Akiyama *et al.*, 1997）の警報フェロモンとしても知られており、*Dermatophagoides pteronyssinus*（ヤケヒョウヒダニ）と *Dermatophagoides farinae*（コナヒョウヒダニ）に対して



図I コナダニ類の代表的な分泌物

20 は集合フェロモンとして作用する (Skelton *et al.*, 2010)。生物活性が不明な種を
21 含めると実に多くのダニが本化合物を分泌していることが分かる (Kuwahara,
22 2004)。コナダニ類に特有の炭化水素として (Z,Z)-6,9-heptadecadiene (6,9-C17) が
23 知られており、コナダニ科を中心に広く分布している (Kuwahara, 2004)。未同定
24 種 *Tortonia* sp. においては警報フェロモンとして機能することが分かっている
25 (Kuwahara *et al.*, 1995)。6,9-C17 は *Carpoglyphus lactis* (サトウダニ、図Ⅱ) の分



図Ⅱ コナダニ類の1種サトウダニの写真

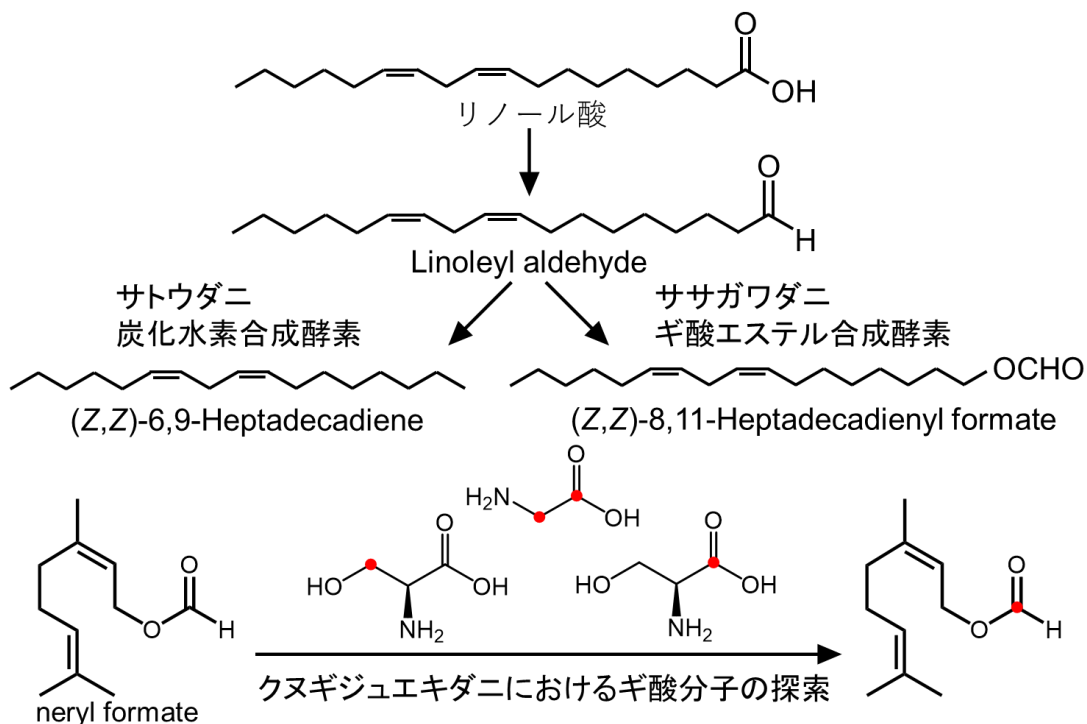
26 泌成分でもあり、虫体を刺激すると警報フェロモンであるネラールとともに 6,9-
27 C17 の分泌量が増加する。6,9-C17 はフェロモンとしての機能のほかに、多様な
28 揮発成分を混合し、効率的に体外に放出するための溶媒としての役割のほか、揮
29 発成分の蒸散速度をコントロールする機能も兼ね備えていると考えられる (清
30 水、2018)。コナダニ類に特徴的な分泌物としてギ酸エステルが挙げられる
31 (Kuwahara, 2004)。(Z,Z)-8,11-Heptadecadienyl formate (8,11-F17) はネダニモドキ属
32 の一種 *Sancassania* sp. Sasagawa (ササガワダニ) の分泌物として近年、同定され
33 た (Shimizu *et al.*, 2016)。このように、コナダニ類の分泌物に対するフェロモン研
34 究は膨大な知見があるにも関わらず、生合成やそれにかかわる酵素の研究事例
35 は少ない。

36 そこで本研究では、コナダニ類の分泌物の脂肪族化合物とモノテルペン類の
37 ギ酸エステルに着目し、酵素学的な解析と有機化学的な手法を用いて生合成経
38 路の解明を目指した (図Ⅲ)。第1章ではサトウダニが分泌する 6,9-C17 の生合
39 成に関する研究を行った。先行研究ではリノール酸 (LA) から 6,9-C17 が誘導さ
40 れているのはわかっているが、その中間体は特定されていない (Shimizu *et al.*,
41 2014)。キイロショウジョウバエの生合成研究の知見を踏まえて、前駆体をリノ

レイルアルデヒド (LAld) と予想して研究を進めた。その結果、サトウダニ粗酵素液に基質として LAld を加え 6,9-C17 に変換されることを確認することができた。

第 2 章ではササガワダニが分泌する 8,11-F17 の生合成経路を検証した。先行研究から、8,11-F17 はサトウダニの炭化水素と同じく LA から誘導されることと、生合成に Baeyer-Villiger 酸化反応が関わっていることが示唆されている (Shimizu *et al.*, 2017)。第 1 章と同じ手法によって直接的に生合成中間体の特定を行った。

第 3 章では neryl formate 分子のギ酸がどのような経路で生合成されるかを探った。コナダニ類のモノテルペンはメバロン酸経路を経由して合成されることが知られている (Morita *et al.*, 2004)。しかし、neryl formate などのギ酸部分の生合成経路は解明されていない。アミノ酸の代謝分解の経路に着目し、¹³C ラベル化合物のトレーサー実験によってギ酸部分の由来について考察した。このようにコナダニ類のフェロモンを含む特有の二次代謝物は、酵素化学的観点からはほとんど研究されていない。本研究ではさらに、コナダニ類の持つ未確認の酵素の殺ダニ剤およびグリーンケミストリーの分野への利用の可能性についても考察を行った。



図Ⅲ 本研究の概要

第1章 サトウダニ *Carpoglyphus lactis* の炭化水素合成酵素

緒言

昆虫は地球上で最も種類の多い生物であり、そのほとんどが陸上に生息している。昆虫が陸上で生活するためには乾燥から身を守る必要がある。そのため、主に炭素数が 25 以上の長鎖炭化水素を分泌することで体表から水分が蒸散するのを防いでいる (Gibbs, 1998)。さらに体表炭化水素は乾燥から身を守るためだけではなく、フェロモンなどの役割も担っている (Howard *et al.*, 2005)。クロオアリ *Camponotus japonicus* の触角上には炭化水素感受性感覚子なる炭化水素を感知するセンサーがある。炭化水素の組成比が同巢と同じであれば反応を示さないが異巢であれば攻撃的にふるまうことが報告されている (Ozaki *et al.*, 2005)。キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の体表炭化水素では性フェロモンなどの役割を持つ長鎖のアルカン、アルケン (C21~C37) が知られている (Qiu *et al.*, 2012)。コナダニ類は炭化水素を含む多くの化合物を分泌している (Kuwahara, 2004)。昆虫と同様にコナダニ類が分泌している炭化水素は耐乾燥性やフェロモンなどの役割を持っている。

サトウダニはダニ目コナダニ亜目サトウダニ科の貯穀害虫である。体長は約 0.4 mm であり、砂糖や味噌などに発生する (江原ら 2009)。警報フェロモンはネラルであり (Kuwahara *et al.*, 1980a, 1980b) その生合成経路は酵素レベルで解明されている (Noge *et al.*, 2005, 2008)。

サトウダニは動物では珍しい LA の生合成能を有し、LA を前駆体として 6,9-C17 が合成されている。先行研究において、安定同位体でラベル化したグルコース [1-¹³C]-D-glucose をサトウダニに摂食させるトレーサー実験を行った結果、偶数炭素がラベリングされた LA と奇数炭素がラベリングされた 6,9-C17 が検出された。偶数炭素がラベリングされた LA と奇数炭素がラベリングされた 6,9-C17 のラベリングパターンが一致したことから、6,9-C17 は LA から、誘導されていることが証明された (Shimizu *et al.*, 2014)。しかし、6,9-C17 生合成の直接の前駆体を含め LA からの詳細な生成機構はこれまで解明されていない。

昆虫、植物、微生物に由来する炭化水素は脂肪族アルデヒドを基質とし aldehyde decarbonylase (AD) によって生合成されることが報告されている (Marsh *et al.*, 2013)。昆虫ではキイロショウジョウバエをはじめ様々な種で AD が発見されている。昆虫 AD はシトクロム P450 であり、キイロショウジョウバエの生合成経路ではステアリン酸が段階を経て octadecanal となり、P450、NADPH、酸素分子によって heptadecane に変換される (Qiu *et al.*, 2012)。それらの知見に基づいて考えると、サトウダニの場合は linoleyl aldehyde (LAld) を基質として何らかの酵素によって 6,9-C17 に変換されると推測できる。そこで本研究では、6,9-

C17 の基質が LAld であるのかを明らかにすることに加えて、6,9-C17 合成酵素の同定を目指した。

一般的にタンパク質を同定する手法として、ゲノム情報からタンパク質を同定する遺伝学的手法とタンパク質を直接検体から抽出する酵素学的手法が用いられる。サトウダニのゲノムは解明されておらず、さらにダニは分類学上、クモに近い生物であるため昆虫をはじめ、植物、微生物の遺伝子情報をそのまま利用するのは難しいと考えた。そこで本研究では酵素学的手法によって目的酵素の精製を進めた。すなわち、サトウダニ粗酵素液を遠心分画法によって活性画分を調製し、さらに目的酵素が膜タンパク質と考えられたのでその可溶化および酵素反応の検討を行った。続いて、 ^{13}C ラベル化 LAld を用いて酵素反応の証明を行った。

材料と方法

1. 供試ダニ

サトウダニは次の方法で継代飼育した。ダニをプラスチックケース (16 cm × 22 cm × 8.5 cm) に入れ、グラニュー糖：乾燥酵母=1：1 を均一に混合したものを飼料として与え、20°C で飼育した。プラスチックケースはフタ付きのもう一回り大きなプラスチックケース内 (21 cm × 27 cm × 10 cm) に保持した。なお、大きいほうの容器内には飽和食塩水を入れ湿度を 75% に保った。

2. LAld、(Z,Z)-9,12-octadecadienol 及び LAld-¹³C₁₈ の合成

LAld と (Z,Z)-9,12-octadecadienol はリノール酸 (Sigma-aldrich) から合成した。フィッシャーエステル化法によってメチルエステル化した後、無水エーテル中で LiAlH₄ を加え還元し、(Z,Z)-9,12-octadecadienol を得た。(Z,Z)-9,12-octadecadienol をジクロロメタンを溶媒として PDC で酸化し LAld を得た。

LAld-¹³C₁₈ は linoleic acid-¹³C₁₈ (Sigma-aldrich) から合成した。TMS-ジアゾメタンを用いてメチルエステル化した後、LiAlH₄ による還元および、PDC 酸化によって LAld-¹³C₁₈ を得た。

3. サトウダニ粗酵素液の調製と遠心分画

サトウダニ生体を飽和食塩水浮遊法にて回収した。集めたサトウダニを乳鉢に移し、抽出バッファー1 (最終濃度 100 mM Tris-HCl (pH7.7)、250 mM スクロース、2.5 ml/g サトウダニ) を加え、氷冷下で破碎した。破碎後、600 × g、10 分、4°C で遠心し sup 1 と ppt 1 を得た。Sup 1 を 9,000 × g、15 分、4°C で遠心し、sup 2 と ppt 2 を得た。Sup 2 を 200,000 × g、45 分、4°C で遠心し、sup 3 と ppt 3 を得た。各沈殿には抽出バッファー1 を加え懸濁させた。

4. サトウダニ粗酵素液を用いた酵素反応

酵素反応液 (全量 400 μl) の組成は、40 mM LAld/acetone 溶液または 40 mM (Z,Z)-9,12-octadecadienol/acetone 溶液 5 μl (終濃度 0.5 mM)、粗酵素液 200 μl、純水 195 μl 加え Tris-HCl buffer (pH7.7) の終濃度 50 mM に調製した。37°C で酵素反応を開始し、30 分後 5 μg/ml octadecane/hexane 溶液 200 μl を加えて、1 分間ボルテックスにかけて抽出した。そのうち、1 μl を GC-MS を用いて分析、定量した。6,9-C17 の同定は GC における保持時間及びマススペクトルで行った。コントロールとして基質を含まない acetone のみを酵素反応液と反応させた。

5. Ppt 3 の可溶化検討

活性が見られた ppt 3 に以下に記す界面活性剤および glycerol を任意の濃度で加え可溶化を試みた。界面活性剤および glycerol の組成は (1% sodium cholate)、(1% sodium cholate + 10% glycerol)、(1% TritonX-100)、(1% TritonX-100 + 10% glycerol)、(1% TritonX-100 + 20% glycerol) である。ミクロソーム画分の沈殿にそれぞれ調製したものを加え 30 分間、4°C で攪拌した。攪拌後、200,000 × g、45 分、4°C で遠心し沈殿と上清に分け、沈殿には可溶化に使用した界面活性剤及び glycerol を加えた。材料と方法 2 に従って各沈殿と上清の酵素活性を測定した。

6. 補酵素の必要性

NADPH 及び NADH が補酵素として機能するか検討するため、材料と方法 2 に示した酵素活性測定法の反応液の組成に NADPH 及び NADH (終濃度はそれぞれ 0.1 mM) を加え酵素反応を行った。酵素液は材料と方法 5 で得られた可溶化画分 (1% TritonX-100 + 20% glycerol の上清)を用いた。

7. 有機溶媒によるタンパク質の沈殿

粗酵素液中に存在する 6,9-C17 を取り除くため、有機溶媒によるタンパク質の沈殿を行った。有機溶媒は、acetone、ethanol、1-propanol を用いた。材料と方法 5 によって調製した可溶化画分に -80°C に冷却した有機溶媒を可溶化画分と 1 : 1 で混合し、-80°C、1 時間静置した。その後、10,000 × g、15 分、4°C で遠心し沈殿を得た。沈殿には 100 mM Tris-HCl (pH7.7)、20% glycerol (2.5 ml/g サトウダニ) を加え懸濁させた。各酵素液を材料と方法 4 によって酵素活性を測定した。

8. LAld-¹³C₁₈ を用いた酵素反応

サトウダニを材料と方法 7 に従い、ethanol 沈殿画分まで調製した。酵素反応液 (全量 400 µl) の組成は、40 mM LAld/acetone 溶液または 40 mM LAld-¹³C₁₈/acetone 溶液 5 µl (終濃度 0.5 mM)、20% glycerol、Tris-HCl buffer 50 mM に調製した。粗酵素液 200 µl を加え 37°C で酵素反応を開始し、30 分後ペンタンで反応生成物を 1 分間抽出した。抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し全量を GC-MS 分析した。コントロールとして基質を含まない acetone のみを酵素反応液と反応させた。

9. 分析条件

ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) は、5975MSD 四重極マスフィルター型質量分析計 (Agilent Technologies) に 6890N ガスクロマトグラフ (Agilent Technologies) を接続したものをを用い、電子イオン化法 (70eV) で測定した。キャピラリーカラムは HP-5MS (内径 : 0.25 mm、長さ : 30 m、膜厚 : 0.25 µm、Agilent

180 Technologies) を用い、2 分間 60°C に保った後、290°C (10°C/min) まで上昇した。
181 その後、5 分間 290°C を保持した。
182 ^1H および ^{13}C 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは Bruker Biospin AC-400M 装置
183 (^1H : 400MHz, ^{13}C : 100MHz) を用い、重クロロホルム中のテトラメチルシランを
184 内部標準として測定した。
185

結果

1. 遠心分画法

遠心分画法によって、ppt 1 (核画分)、ppt 2 (ミトコンドリア画分)、ppt 3 (ミクロソーム画分)、sup 3 (細胞質画分) に分画することができた。一般的に核画分には核膜に局在する膜タンパク質、ミトコンドリア画分には電子伝達系のタンパク質、ミクロソーム画分には P450 などの膜タンパク質、細胞質画分には水溶性タンパク質が分画される。サトウダニの粗酵素液を遠心分離し得られた画分に基質である LAld を加えた結果、すべての画分に 6,9-C17 が確認できた (図 1-1)。Mann-Whitney 検定により統計処理を行ったところ、ミクロソーム画分にコントロールに対して危険値 5% 水準で有意差を得た。ミクロソーム画分で 6,9-C17 の生成が確認できたことから、サトウダニ粗酵素のミクロソーム画分に目的酵素が存在することが分かった。6,9-C17 の前駆体が LAld であることが示唆された。

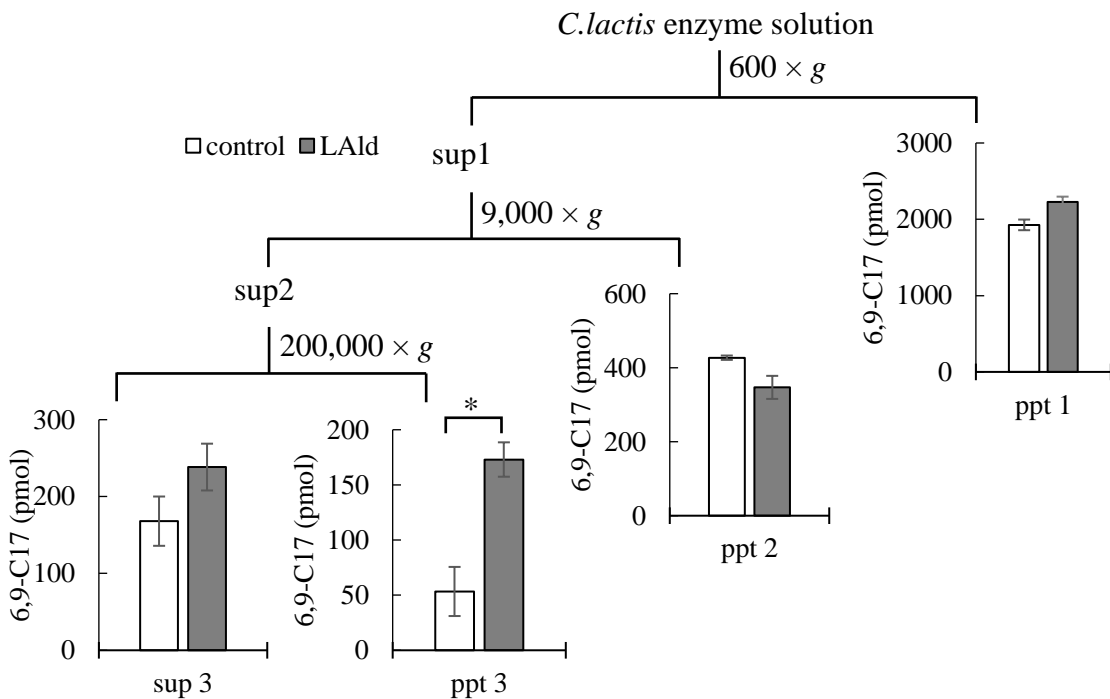


図 1-1 分画スキームと各画分を用いた酵素反応による 6,9-C17 生成量

LAld とは基質を加えたものである。コントロールと LAld から得られた 6,9-C17 の検出量を示した。N = 5、± SE、*: P < 0.05

2. 基質特異性

Ppt 3 に基質として LAld を加えると 6,9-C17 が生成されるが, (Z,Z)-9,12-octadecadienol を加えても 6,9-C17 は生成されなかった (図 1-2).

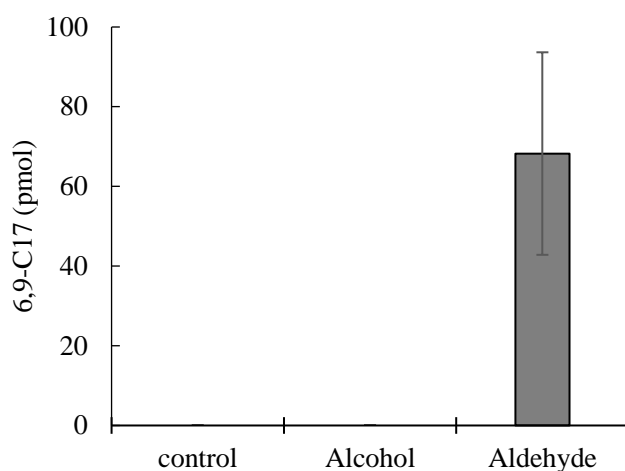


図 1-2 ミクロソーム画分の基質特異性

Alcohol は (Z,Z)-9,12-octadecadienol, Aldehyde は LAld, control はネガティブコントロールである. $N = 5, \pm SE$,

3. Ppt 3 の可溶化検討

サトウダニ粗酵素から得られたミクロソーム画分に様々な組成の界面活性剤と glycerol を加え、可溶化を試みた結果、TrironX-100 を用いたフラクションの上清に 6,9-C17 を検出した。Mann-Whitney 検定により統計処理を行ったところ、1% TritonX-100 + 20% glycerol で可溶化し得られた上清で酵素活性が見られた (図 1-3)。この結果より、1% TritonX-100 + 20% glycerol の添加で目的酵素が活性を保ったまま可溶化できることが分かった。コール酸ナトリウムを用いた場合、上清と沈殿どちらも活性が見られなかった。コール酸ナトリウムによる目的酵素の失活あるいは選択的な可溶化によって必要なタンパク質が分離してしまった可能性がある。

4. 補酵素の必要性

LAld から 6,9-C17 への変換効率を向上させるべく、補酵素として NADPH および NADH を検討した。その結果すべてのフラクションに酵素活性が認められた (図 1-4)。NADPH を加えたものは 6,9-C17 の生産量が 27%増加し、NADH では 4%増加した。しかし、各生産量との差に有意差は認められないので、補酵素は必ずしも必要ではないと判断した。

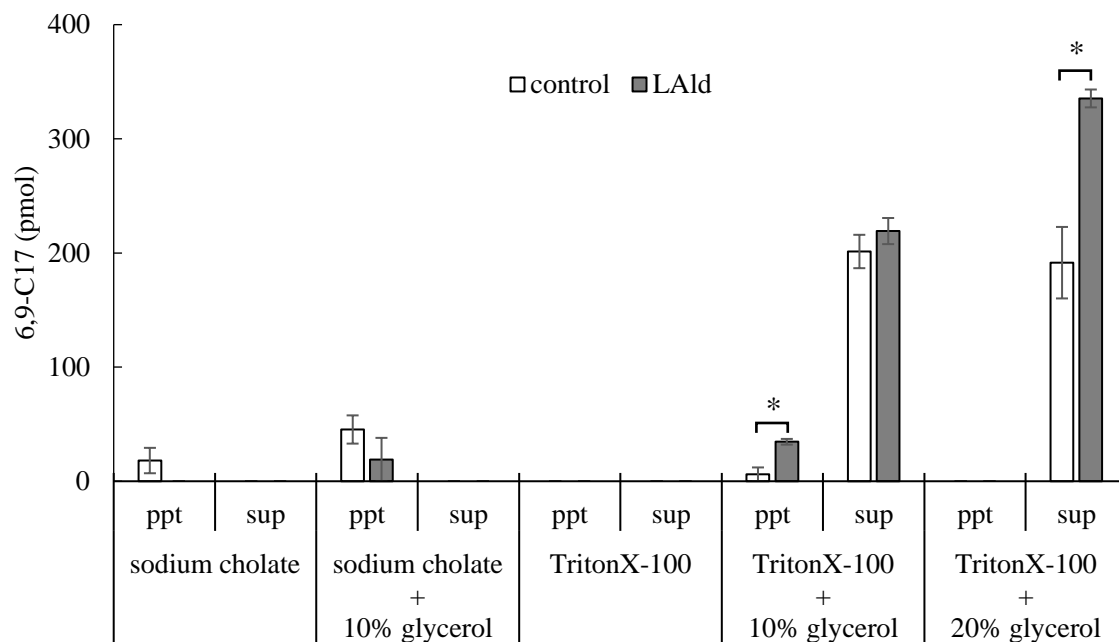


図 1-3 目的酵素の可溶化検討

LAld とは基質を加えたものである。コントロールと LAld から得られた 6,9-C17 の検出量を示した。N = 5、± SE、*: $P < 0.05$

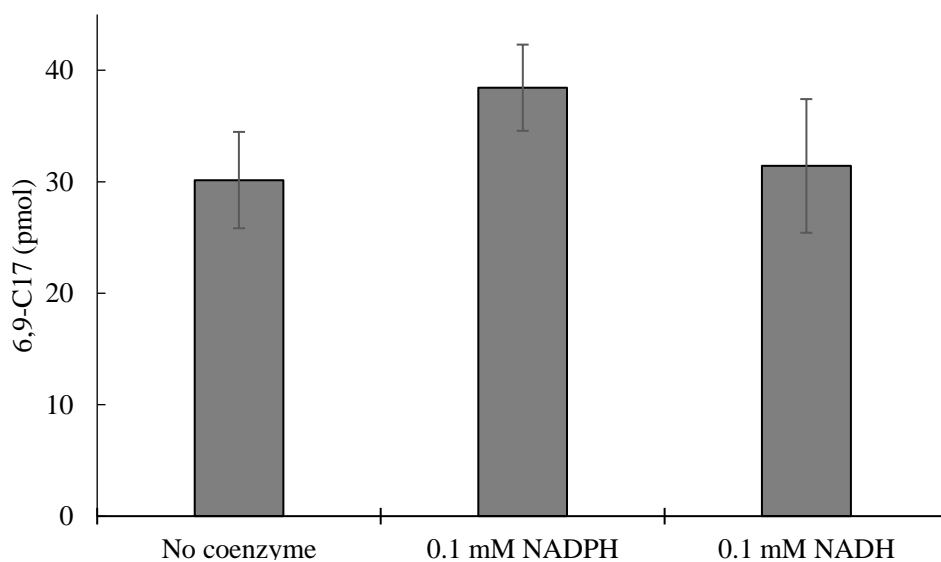


図 1-4 補酵素の検討

LAld の 6,9-C17 検出量からコントロールの 6,9-C17 検出量を差し引いて平均を求めたものを示した。N = 5、± SE

224 5. 有機溶媒によるタンパク質の沈殿

225 有機溶媒で沈殿させた酵素を酵素反応に供した結果、エタノールと 1-プロパ
 226 ノールのコントロールの 6,9-C17 が消失した (図 1-5)。活性の度合いから、エ
 227 タノールが適していると判断した。

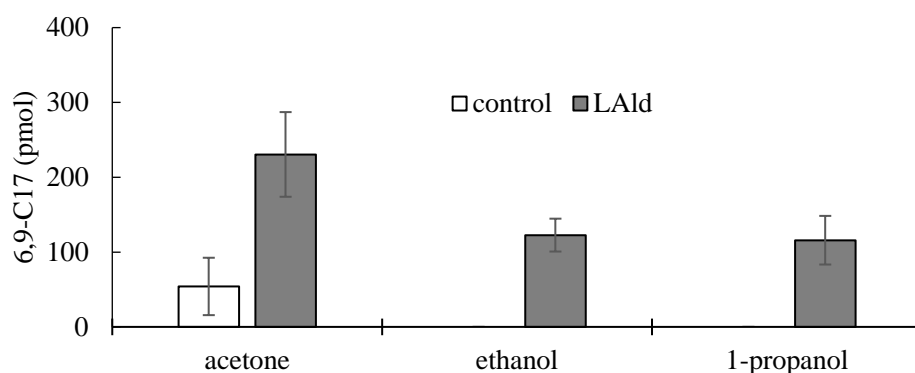


図 1-5 有機溶媒によるタンパク質沈殿の検討

LAld とは基質を加えたものである。コントロールと LAld から得
 られた 6,9-C17 の検出量を示した。N = 5、± SE

228 6. LAld- $^{13}\text{C}_{18}$ を用いた酵素反応

229 LAld から生成された 6,9-C17 と LAld- $^{13}\text{C}_{18}$ から生成された 6,9-C17- $^{13}\text{C}_{18}$ のマ
 230 ススペクトルを比較した (図 1-6)。6,9-C17 の分子イオンは M^+ 236 に対し、6,9-
 231 C17- $^{13}\text{C}_{18}$ の分子イオンは 17 Da シフトした M^+ 253 が確認できた。6,9-C17 と
 232 6,9-C17- $^{13}\text{C}_{18}$ を比較すると、 m/z 44 [$^{13}\text{C}_3\text{H}_5^+$] と m/z 41 [$(\text{C}_3\text{H}_5)^+$]、 m/z 59
 233 [$^{13}\text{C}_4\text{H}_7^+$] と m/z 55 [$(\text{C}_4\text{H}_7)^+$]、 m/z 72 [$^{13}\text{C}_5\text{H}_7^+$] と m/z 67 [$(\text{C}_5\text{H}_7)^+$]、 m/z 87

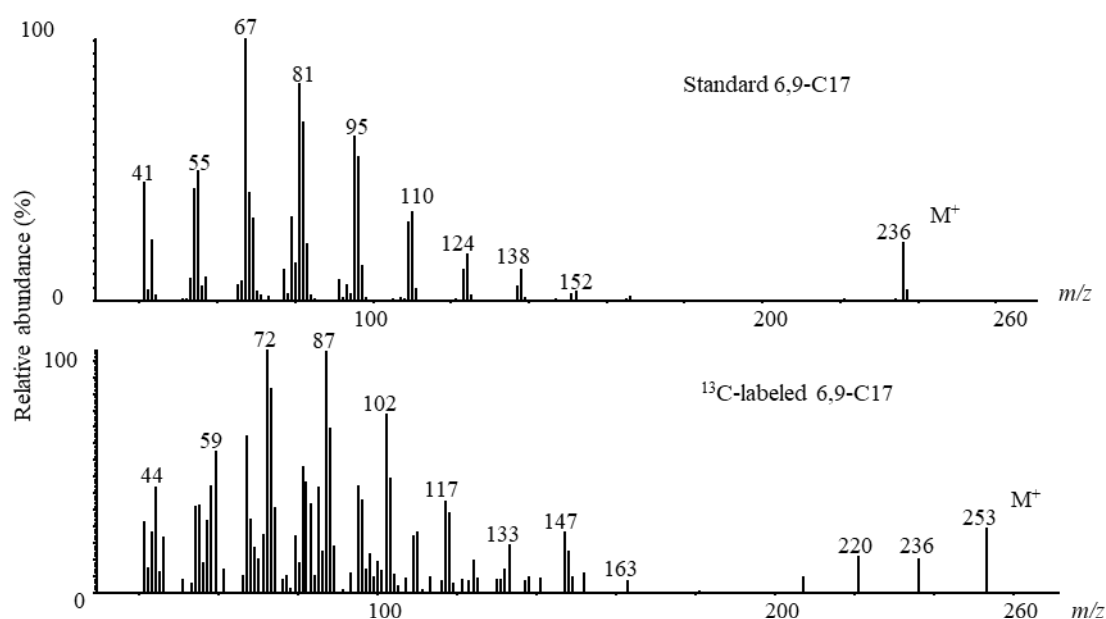


図 1-6 6,9-C17 と 6,9-C17- $^{13}\text{C}_{18}$ のマスペクトル

234 $[(^{13}\text{C}_6\text{H}_9)^+]$ と $m/z81[(\text{C}_6\text{H}_9)^+]$ 、 $m/z102[(^{13}\text{C}_7\text{H}_{11})^+]$ と $m/z95[(\text{C}_7\text{H}_{11})^+]$ で対応する
235 フラグメントイオンを確認することができた。
236

237 考察

238 サトウダニ粗酵素液に基質として LAld- $^{13}\text{C}_{18}$ を用いると 6,9-C17- $^{13}\text{C}_{18}$ が生成
239 されたことから 6,9-C17 の前駆体が LAld であることが明らかとなった。さら
240 に、遠心分画法においてマイクロソーム画分に目的酵素が存在することが分かっ
241 た。念のため一連の反応が酵素反応であることを証明するため、サトウダニ粗
242 酵素液を調製後、80°C で 30 分間静置する予備実験を行った。予想通り、ミク
243 ロソーム画分の酵素活性を測定したが、6,9-C17 は検出されなかった。本実験
244 で目的酵素が高温で失活することを確認することができた。

245 脂肪族アルデヒドを基質とし炭化水素を生合成する酵素はサトウダニ以外に
246 昆虫ではキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (Qiu *et al.*, 2012)、イ
247 エバエ *Musca domestica* (Qiu *et al.*, 2012)、エンドウヒゲナガアブラムシ
248 *Acyrtosiphon pisum* (Chen *et al.*, 2016)、トノサマバッタ *Locusta migratoria* (Yu *et al.*, 2016) で知られている。さらに、アメリカマツノキクイムシから同定された
249 CYP4G55 では脂肪族アルデヒドに加えてアルコールを基質としても炭化水素の
250 生成が認められた (MacLean *et al.*, 2018)。微生物ではシアノバクテリアの仲間
251 である *Nostoc punctiforme* (Warui *et al.*, 2011)、植物ではエンドウ *Pisum sativum*
252 (Belhaddad *et al.*, 2000)、緑藻類に属する *Botryococcus braunii* (Dennis *et al.*, 1992)
253 で報告されている。このように様々な生物で AD は知られているがダニ目では
254 これまで報告例はない。昆虫 AD とサトウダニの炭化水素合成酵素を比較して
255 みると、両酵素とも膜タンパク質であることは共通しているが、ダニ炭化水素
256 合成酵素は補酵素を必要としなかった。よって目的酵素はコナダニに特有のもの
257 である可能性が強く示唆される。

259 サトウダニは 6,9-C17 以外では tridecane、pentadecane、(Z)-7-pentadecene、
260 pentacosane、heptacosane、nonacosane など複数の炭化水素を分泌している
261 (Kuwahara, 2004)。基質特異性などの酵素学的解析を行うことによって、目的酵
262 素とそれらの炭化水素の生合成の関係性を明らかにすることができると考えて
263 いる。

264 サトウダニ粗酵素液の遠心分画により、目的酵素が 200,000 x g のマイクロソ
265 ム画分に存在することが分かった。基質を加えていないコントロールにも 6,9-
266 C17 が検出された原因として、粗酵素液を調製する段階ですでに目的酵素が基
267 質または 6,9-C17 と複合体を形成していたものが、酵素反応を行った際に 6,9-
268 C17 が目的酵素から遊離して検出されたと推察した。核画分に多く 6,9-C17 が
269 検出されているがこれは目的酵素由来ではなく未破砕のダニなどに付着した
270 6,9-C17 などが原因ではないかと考えている。ミトコンドリア画分及び細胞質
271 画分に検出されたが、6,9-C17 の量にばらつきが見られたため、ダニ由来の内
272 在性のものであると考えられる。

サトウダニ粗酵素液から調製したミクロソーム画分に 1% TritonX-100 + 20% glycerol を含むバッファー（可溶化バッファー）を用いた結果、目的酵素の可溶化に成功した。TritonX-100 のみのバッファーを用いると、上清と沈殿どちらも 6,9-C17 を検出できなかったので酵素が失活したと考えられる。Glycerol を添加するにつれて上清に 6,9-C17 が検出され、glycerol を 20% 添加するとコントロールと比較して危険値 5% 水準で有意差が得られた。このことにより 1% TritonX-100 を用いると目的酵素を可溶化することができ glycerol を 20% 添加することによって目的酵素の失活を防いだと考えた。コール酸ナトリウムを用いた場合、上清と沈殿どちらも活性が見られなかった。P450 は P450 還元酵素との相互作用によって活性化される。複数の酵素が関与して 6,9-C17 が生成されることを考慮すると、必要な酵素が分離してしまった可能性がある。酵素反応中に P450 還元酵素を添加し、活性の増減を確認することによってより詳しい目的酵素の性質が分かると考えられる。

補酵素の必要性の検討では、目的酵素の可溶化画分に NADPH および NADH を加え酵素反応を行った。その結果、補酵素無添加の可溶化画分と比較すると 6,9-C17 生産量に差は認められなかったので補酵素の必要性はないと判断した。シトクロム C を酵素反応中に添加すると内在性の補酵素を消費でき、より正確な補酵素の検討が可能である。報告されている昆虫 AD では炭化水素合成に NADPH が必要であるが、ダニ炭化水素合成酵素は補酵素を加えなくとも 6,9-C17 が生成した。すなわち、既存 AD とは異なる反応機構でアルデヒドから炭化水素に変換している可能性が高い。

ミクロソーム画分には膜タンパク質が多く存在するので目的酵素も膜タンパク質であると考えている。その画分はシトクロム P450 などのタンパク質が存在し、昆虫の AD は CYP4 ファミリーである。一方でハダニ *Teranychus urticae* およびマダニ *Ixodes scapularis* では CYP4 ファミリーの遺伝子が見つからない。以上のことからサトウダニがもつ炭化水素合成酵素は新規な酵素および反応機構が関わっていると考えている。

目的酵素の同定ができれば、酵素を阻害する物質の探索を行い、将来、農害やアレルギーを誘発することで問題になっているコナダニを選択的に駆除できる殺ダニ剤を開発できるかもしれない。さらにバイオテクノロジーの視点から炭化水素はバイオ燃料の工業的な製造につながる例も見られるため (Lin *et al.*, 2015)、ダニ由来の遺伝子がジェット燃料や軽油の供給に利用される日が来るかもしれない。

第2章 ネダニモドキ属ダニ *Sancassania* sp. Sasagawa のギ酸エステル合成酵素

緒言

コナダニ類の分泌物には特徴的なギ酸エステルが数多く確認されており、テルペン類では neryl formate、geranyl formate、芳香族化合物では rhizoglyphinyl formate、脂肪族化合物では lardolure (*(R,R,R,R)*-1,3,5,7-tetramethyldecyl formate)、(*Z*)-8-heptadecenyl formate (8-F17)、(*Z,Z*)-8,11-heptadecadienyl formate (8,11-F17)である (Kuwahara, 2004)。Neryl formate はコナダニの警報フェロモンとして初めて同定された化合物である (Kuwahara *et al.*, 1975)。その後、警報フェロモンとして様々なコナダニ類で同定されている (Kuwahara, 2004)。近年では家塵性チリダニ科ダニの集合フェロモンとしても報告された (Skelton *et al.*, 2010)。Lardolure はコウノホシカダニ (*Lardoglyphus konoi*) の集合フェロモンであるが、サトウダニやケナガコナダニ (*Tyrophagus putrescentiae*)、ムギコナダニ (*Aleuroglyphus ovatus*) も同様に誘引する (Yen *et al.*, 1980、Kuwahara *et al.*, 1982、Kuwahara *et al.*, 1991)。

ネダニモドキ属の一種ササガワダニ (*Sancassania* sp Sasagawa) から新規な分泌物として 8-F17 と 8,11-F17 が同定された (Shimizu *et al.*, 2016)。性フェロモンとして rosefuran が報告されており、さらに 2-phenylethanol と組み合わせることによって誘引活性を発揮すると報告されている (Kuwahara, 2004)。

ササガワダニ hexane 抽出物を GC-MS で分析すると、主な分泌物として 8-F17 と 8,11-F17、炭化水素の(*Z*)-8-heptadecene (8-C17)、6,9-C17 が検出された (図 2-1)。この分析結果から脂肪族ギ酸エステルと炭化水素には量的な関連性があることが分かる。つまり、8-F17 と 8,11-F17 を比較すると 8,11-F17 の方が分泌量は多く、8-C17 と 6,9-C17 を比較すると 8-C17 の方が多く分泌されている

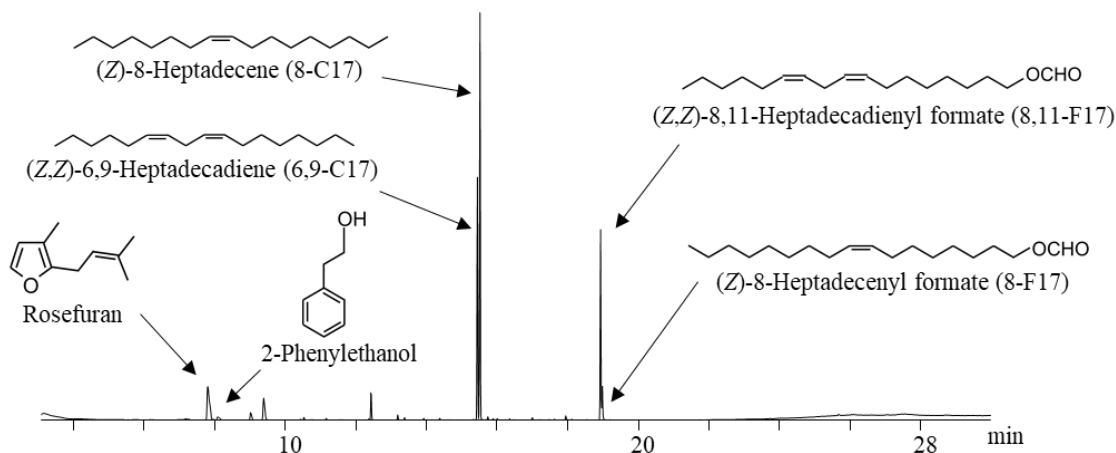


図 2-1 ササガワダニ抽出物の GC-MS 結果

ることが分かる。同じ基質を使っているにもかかわらず、分泌物の生成量を調節する機構は生化学的に興味深い。

これまでの生合成研究として、ササガワダニに対する[1-¹³C]-酢酸ナトリウムのトレーサー実験が行われ、8, 11-F17 は LA から誘導されることが証明された (Shimizu *et al.*, 2017)。すなわち、ササガワダニに[1-¹³C]-酢酸ナトリウムを摂食させると、ギ酸部分と偶数炭素がラベリングされた 8,11-F17 が検出された。さらに、[1-¹³C]-stearic acid を摂食させると、ギ酸部分がラベリングされた 8, 11-F17 が検出された (Shimizu *et al.*, 2017)。8,11-F17 の推定合成経路ではアセチル CoA から 2 個単位で炭素鎖が伸長されて stearic acid となり、不飽和化によって合成された LA を原料として 8,11-F17 が生成される (図 2-2)。このことから、8,11-F17 の合理的な生合成を考えると、LA から誘導される LAld が Baeyer-Villiger 酸化反応によって一段階で 8,11-F17 に変換されることが強く示唆された。

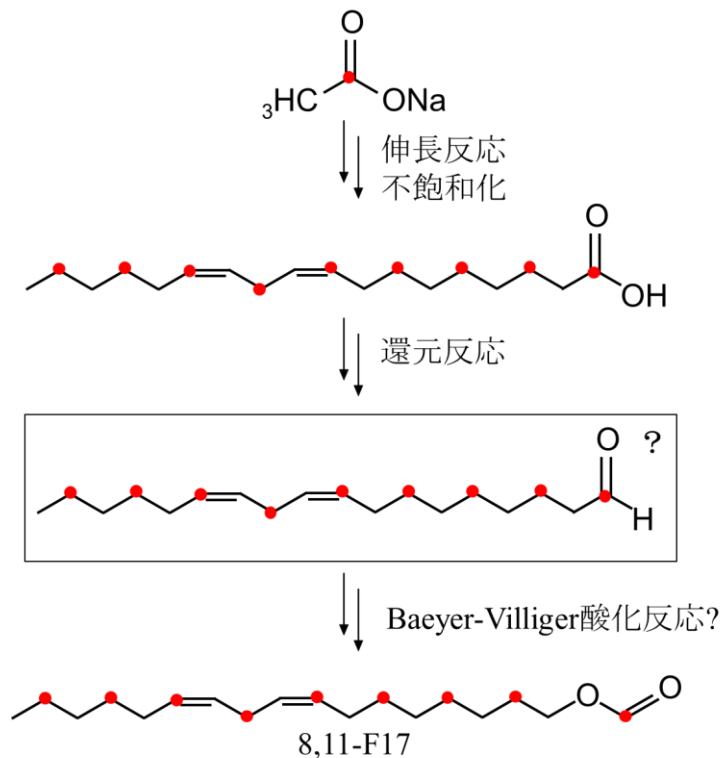


図 2-2 8,11-F17 の推定される合成経路 Shimizu *et al.*, 2017、一部
改変

Baeyer-Villiger 酸化酵素 (Baeyer-Villiger monooxygenase ; BVMO) は微生物や植物 (Tolmie *et al.*, 2018)、ヒトの肝臓 (Fiorentini *et al.*, 2016) などから発見されており、主に環状ケトンをラクトンに、芳香族ケトンをエステルに変換する反

348 応を触媒する。しかし、ダニ由来の BVMO は脂肪族アルデヒドをギ酸エステ
349 ルに変換できることから、従来の BVMO とは反応形式が異なる。このような
350 背景のもと、第 1 章と同じく酵素学的手法によって目的酵素の同定を目指し
351 た。
352

材料と方法

1. 供試ダニ

ササガワダニは寒天培地で継代飼育した。寒天培地は表 2-1 寒天培地の組成の組成で調製し、プラスチックシャーレ (9 cm × 2 cm) で作成した。十分培地が冷えた後にササガワダニを移し替え、20°C で飼育した。湿度を保つためチャック付きポリ袋に入れた。

表 2-1 寒天培地の組成

	オートクレープ前に添加		オートクレープ後に添加	
シャーレ 30 枚あたり	水道水	250 ml	プロピオン酸	0.75 ml
	寒天	5 g	ボーキニン	2.5 ml
	トウモロコシ粉	30 g	大豆油	0.5 ml
	乾燥酵母	30 g	ストレプトマイシン	1 g

2. LAld-d₂ の調製

LAld-d₂ はリノール酸 (Sigma-aldrich) から合成した。フィッシャーエステル化法によってメチルエステル化した後、MeOD と MeONa でリノール酸メチルの α 水素を重水素に置換した。得られたリノール酸メチル-d₂ を無水エーテル中で LiAlH₄ を加え還元し、(Z,Z)-9,12-octadecadienol-d₂ を得た。(Z,Z)-9,12-octadecadienol は無水ジクロロメタンを溶媒として PDC で酸化し LAld-d₂ を得た。

3. ササガワダニ粗酵素の調製と遠心分画

ササガワダニ生体をダニ培地から回収した。集めたササガワダニを乳鉢に移し、抽出バッファー2 (最終濃度 100 mM Tris-HCl (pH7.5)、250 mM スクロース、2.5 ml/g ササガワダニ) を加え、氷冷下で破碎した。破碎後、600 × g、10 分、4°C で遠心し sup 1 と ppt 1 を得た。Sup 1 を 9,000 × g、15 分、4°C で遠心し、sup 2 と ppt 2 を得た。Sup 2 を 200,000 × g、45 分、4°C で遠心し、sup 3 と ppt 3 を得た。各沈殿には抽出バッファー2 を加え懸濁させた。

4. ササガワダニ粗酵素液を用いた酵素反応

酵素反応液 (全量 400 μl) の組成は、40 mM LAld/acetone 溶液または 40 mM LAld-d₂/acetone 溶液または 40 mM LAld-¹³C₁₈/acetone 溶液 5 μl (終濃度 0.5 mM)、粗酵素液 200 μl、純水 195 μl 加え Tris-HCl buffer (pH7.5) の終濃度 50 mM に調製した。37°C で酵素反応を開始し、30 分後 5 μg/ml octadecane/hexane 溶液 200 μl で反応生成物を 1 分間抽出した。そのうち、1 μl を GC-MS を用い

384 て分析、定量した。8,11-F17 の同定は GC における保持時間及びマススペクト
385 ルで行った。8,11-F17 の定量は m/z 280 のイオン抽出、ラベル体 LAld で生成さ
386 れると予想される 8,11-F17- d_2 の定量は m/z 281 及び 282、8,11-F17- $^{13}C_{17}$ の定量
387 は m/z 297 で行った。コントロールとして基質を含まない acetone のみを酵素反
388 応液に加えた。

389

390 5. 分析条件

391 第 1 章の方法と材料 9 を参照した。

結果

1. 遠心分画

酵素反応によって得られた 8,11-F17 は LAld のピークと重なるので m/z 280 でイオン抽出することによって検出した (図 2-3)。ミクロソーム画分の酵素反応で得られた 8,11-F17 はササガワダニ抽出物の 8,11-F17 のマススペクトルマススペクトルを比較することによって同定した (図 2-4)。他の画分の 8,11-F17 も同じ手法で同定した。この結果、ササガワダニの粗酵素液を遠心し得られた画分に基質である LAld を加えると核画分、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分で 8,11-F17 が生成されたことを確認できた (図 2-5)。Mann-Whitney 検定により統計処理を行ったところ、ミクロソーム画分にコントロールに対して危険値 5%水準で有意差を得た。ミクロソーム画分で 8,11-F17 の生成が確認できたことから、ササガワダニ粗酵素のミクロソーム画分に目的酵素が存在することが分かった。また 8,11-F17 の前駆体が LAld であることが示唆された。核画分、ミトコンドリア画分で 8,11-F17 が検出されたのは破碎後のダニの残骸などから抽出されたものと考えている。

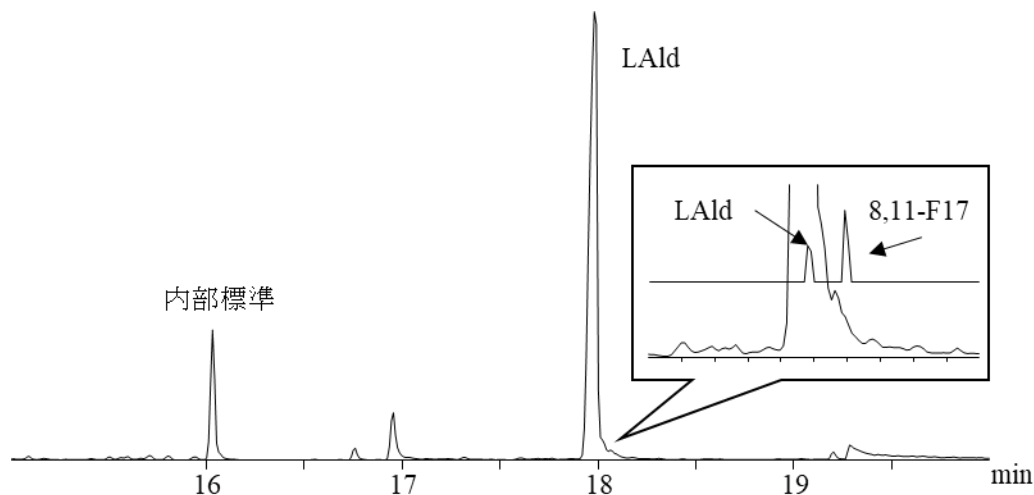


図 2-3 酵素反応 (ミクロソーム画分) 抽出物の GC-MS 分析

拡大図は m/z 280 のイオン抽出で得られた GC クロマトグラム (上) と抽出物の GC クロマトグラム

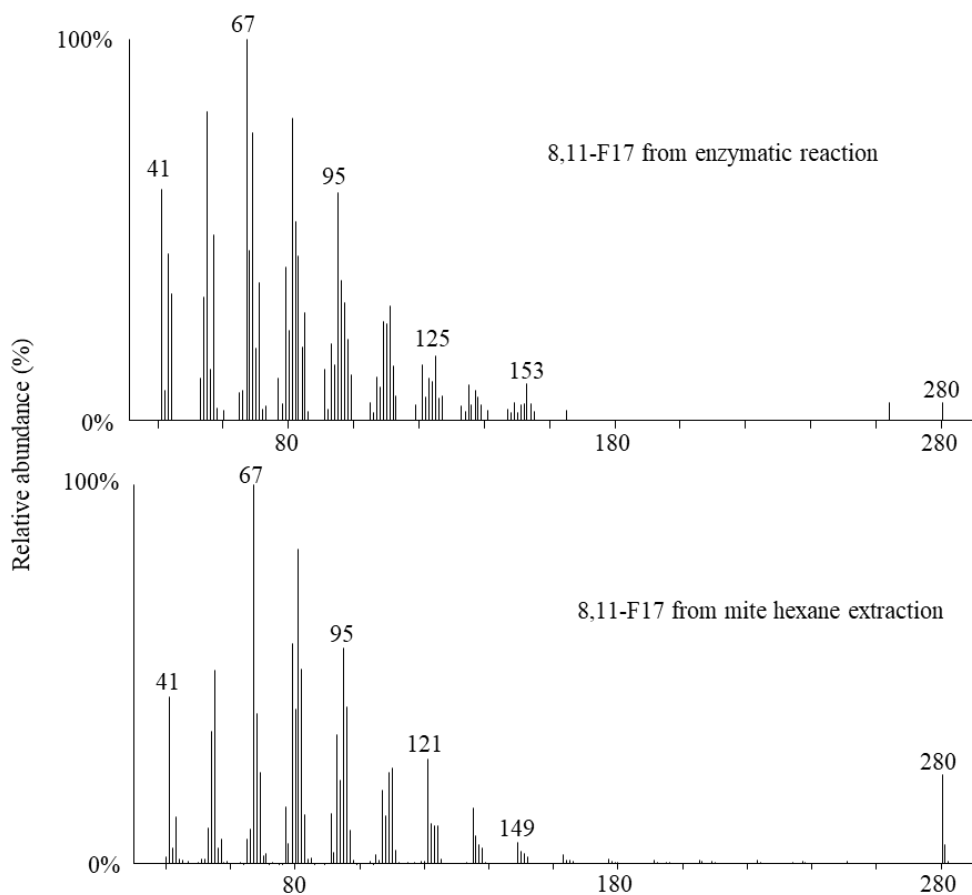


図 2-4 酵素反応で得られた 8,11-F17 とササガワダニ抽出物から得られた 8,11-F17

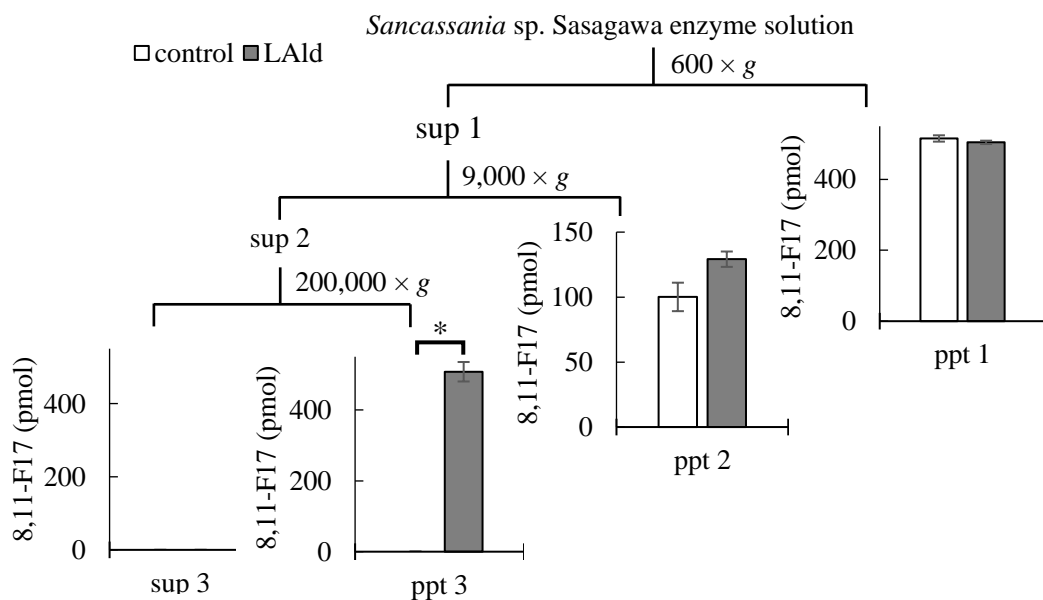


図 2-5 分画スキームと各画分を用いた酵素反応による 8,11-F17 生成量

LAld とは基質を加えたものである。コントロールと LAld から得られた 8,11-F17 の検出量を示した。N = 5、± SE、*: P < 0.05

2. ラベル体 LAld を用いた酵素反応

合成したラベル体 LAld を用いて酵素反応を行った。LAld- $^{13}\text{C}_{18}$ を基質とした酵素反応では ^{13}C ラベル体 6,9-C17 は確認することはできなかった。LAld- d_2 を基質とした酵素反応では、重水素化されていない 8,11-F17 であった。LAld と LAld- d_2 を用いた時の 8,11-F17 の生成量を比較すると同等量であることが分かった (図 2-6)。さらに、酵素反応時に添加した LAld- d_2 は重水素化されたままであった。これらのことから、酵素反応中に α 水素の重水素が水素に交換されてしまったと推測した。

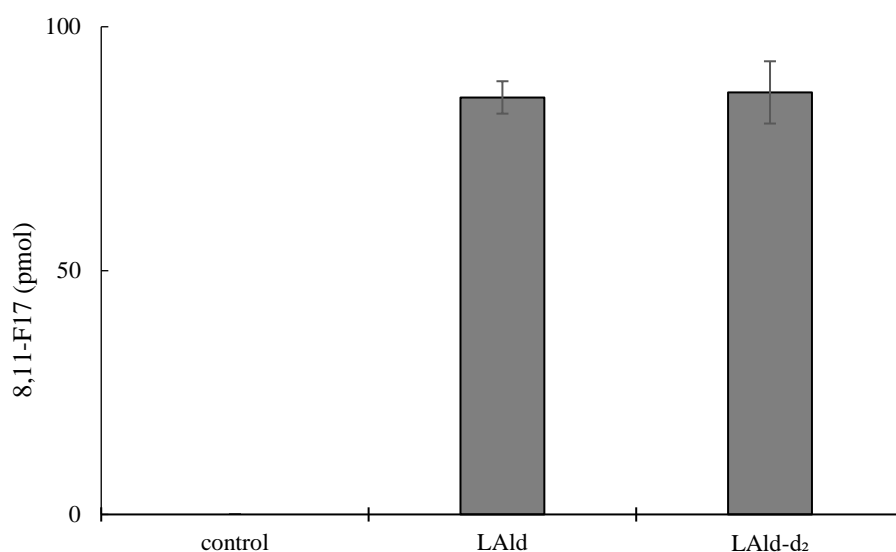


図 2-6 LAld と LAld- d_2 を用いた酵反応の比較

417 考察

418 ササガワダニ粗酵素液を用いて酵素反応を検討したところ、8,11-F17 の前駆体
419 が LAld であることが示唆された。さらに、遠心分画法においてミクロソーム画
420 分に目的酵素が存在することが判明した。このことから、LAld を基質とした
421 Baeyer-Villiger 酸化反応によって、8,11-F17 が生産されることがわかった。ミク
422 ロソーム画分は P450 などの膜タンパク質が多く局在する画分である。ササガワ
423 ダニギ酸エステル合成酵素は膜タンパク質と予想できる。目的酵素を同定する
424 ためには、可溶化の検討が必要であると考えている。既知の BVMO では補酵素
425 が必要であるが、ササガワダニギ酸エステル合成酵素は補酵素を添加しなくて
426 も反応が進む点が特徴である。第 1 章で述べたよう、補酵素の検討をさらに行
427 う必要がある。

428 LAld- $^{13}\text{C}_{18}$ を基質として用いた酵素反応実験では、ラベル化された 8,11-F17 を
429 確認することができなかった。ラベル化 8,11-F17 が検出できなかった理由の一
430 つとして、生成量が GC-MS の検出限界を下回ったことが挙げられる。GC の分
431 析において LAld と 8,11-F17 のどちらも十分量を GC 分析に供すると 2 つのピー
432 クはよい分離を示す。しかし、酵素反応では、用いる LAld の量が多いため、LAld
433 のピークがテーリングする傾向にある。現段階では薄層クロマトグラフィーの
434 分析（展開溶媒 50%benzene/pentane）によって、LAld の Rf 値 0.2、8,11-F17 の
435 Rf 値 0.3 が確認できている。このことから、酵素反応で得られた抽出物をシリ
436 カゲル精製によって LAld と 8,11-F17- $^{13}\text{C}_{18}$ を分離することによって 8,11-F17-
437 $^{13}\text{C}_{18}$ を濃縮し分析することができると考えられる。

438 BVMO の研究は、微生物学におけるステロイドに関する研究を皮切りに発展
439 していった (Turfitt, 1948)。これまで発見されてきた主な BVMO はケトンや環状
440 ケトンエステルをラクトンに変換させる。植物ホルモンの一種であるプラシ
441 ノライドは生合成経路の最終段階に植物 BVMO を用いて、環状ケトンエステルをラクト
442 ンに変換している (Yokota *et al.*, 1990、Nomura *et al.*, 2005)。微生物では酵素の立
443 体構造、機能、特徴などが詳細に研究されている。一次代謝化合物や二次代謝化
444 合物の生合成に深く関与しているので、微生物にとって非常に重要な役割を担
445 っている (Tolmie *et al.*, 2018)。動物の BVMO はヒトの肝臓で初めて発見された
446 (Fiorentini *et al.*, 2016)。主に薬物代謝に関わる酵素として機能しており、二次機
447 能として NADPH オキシダーゼのような機能が期待されている。

448 これまで発見された BVMO は、ケトンや環状ケトン、短鎖脂肪族アルデヒド
449 を Baeyer-Villiger 酸化によってエステルまたはラクトンに変換することが報告
450 されているが、ダニギ酸エステル合成酵素は LAld を基質として一段階でギ酸エ
451 ステル 8,11-F17 に変換することができる点で他の酵素と反応形式が異なる。

BVMO は有用な酵素であり、特にグリーンケミストリーの分野で注目されている。天然物の生合成における立体選択的な Baeyer-Villiger 酸化に注目して、ラセミ体のケトン光学活性なラクトンやエステルを合成するのに利用されている (Leisch *et al.*, 2018)。 *Aspergillus flavus* 由来の BVMO は、炭素鎖 5~10 までの脂肪族アルデヒドを脂肪族ギ酸エステルに変換することができる (Ferroni *et al.*, 2017)。ギ酸エステルに変換することによって緩和に行える減炭反応として活用することができるなど、BVMO は幅広い有用性を秘めている。ササガワダニ BVMO は炭素鎖の長い脂肪族アルデヒドをギ酸エステル化することができる。本反応はどの生物種からも確認されていないため、極めて特異的な酵素が関与すると推察している。目的酵素の単離・同定を行い、酵素化学的解析を行うことによって、グリーンケミストリーの分野に貢献できる可能性を秘めている。

第3章 コナダニ類の警報フェロモン neryl formate の生合成経路

緒言

今から 45 年前にケナガコナダニの警報フェロモンとしてモノテルペンのギ酸エステル neryl formate が同定された (Kuwahara *et al.*, 1975)。これを皮切りにコナダニ類のフェロモン研究は進展してきた。Neryl formate は nerol のギ酸エステルであり、モノテルペン類の生合成経路は ^{13}C ラベル化合物のトレーサー実験により解明されている (Morita *et al.*, 2004)。すなわち、サトウダニに $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-glucose}$ を摂食させると、2、4、6、8、9、10 の位置に安定同位体炭素が導入された neral が検出された (図 3-1)。この結果から、nerol もメバロン酸経

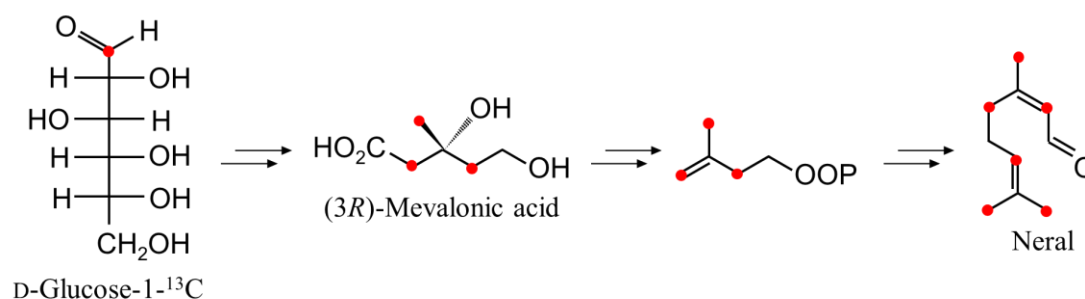


図 3-1 Neral の生合成経路

路で合成されると考えられる。このようにコナダニ類に由来するテルペンはメバロン酸を経由する経路で合成されると推察できるが、ネロールと縮合するギ酸がどのように生合成されるかは不明である。

オオアリ属の一種 *Camponotus pennsylvanicus* の防御物質であるギ酸については約 40 年前に生合成研究が行われている。放射性炭素でラベル化されたグリシン、セリン、ヒスチジンをそれぞれアリの毒腺と共にインキュベートすると、分泌腺内に存在する細胞によってギ酸がラベル化すると報告された (図 3-2) (Hefetz *et al.*, 1978)。さらにラベル化されたテトラヒドロ葉酸 (THF) 誘導体を用いてギ酸の生合成経路が詳しく説明された。毒腺の粗抽出液に $5,10\text{-}^{14}\text{C}$ -メチレン THF を加えるとラベル化されたギ酸が検出されている。ラベリングパターンを整理すると、グリシン、セリン、ヒスチジンはそれぞれアミノ酸の代謝分解によって THF 誘導体に炭素が導入される。導入される炭素はセリンの 3 位、グリシンの 2 位、ヒスチジンの 2 位である。ラベル体が導入された THF 誘導体はホルミル基が脱離され、ラベル化ギ酸を生成する。

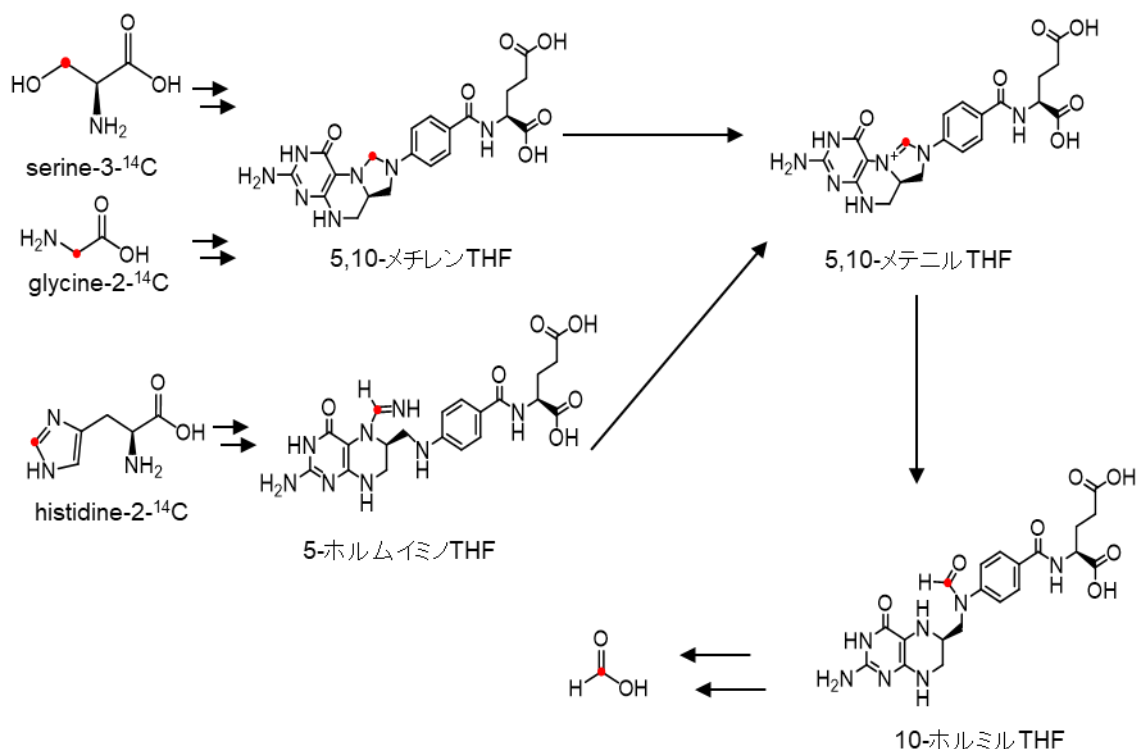


図 3-2 オオアリ属の一種 *C. pennsylvanicus* におけるギ酸の生合成経路

本研究では **neryl formate** を分泌するクヌギジュエキダニ (*Hericia sanukiensis*) を用いてギ酸部分の生合成前駆体を探索した。本種ダニは 2006 年に新種として発見されたコナダニである (Fashing *et. al.*, 2006)。クヌギの樹液から発見され、オスとメスで明確に形態が異なっている。オスはひし形のような輪郭をしており平らな形状をしている。メスは丸くオスより厚みのある形状をしている。オスとメスに分けてそれぞれについて GC-MS 分析を行うと、主要なピークとしてオスとメス共通成分である **neral**、**geranial**、**neryl formate**、**tridecane** を検出することができた (図 3-3)。**γ-Acaridial** はメスのみで確認できた。

まずはアリの先行研究に基づいて安定同位体ラベル化アミノ酸を給餌して、**neryl formate** のギ酸部分が同位体でラベル化されるかを GC-MS 解析により検証した。

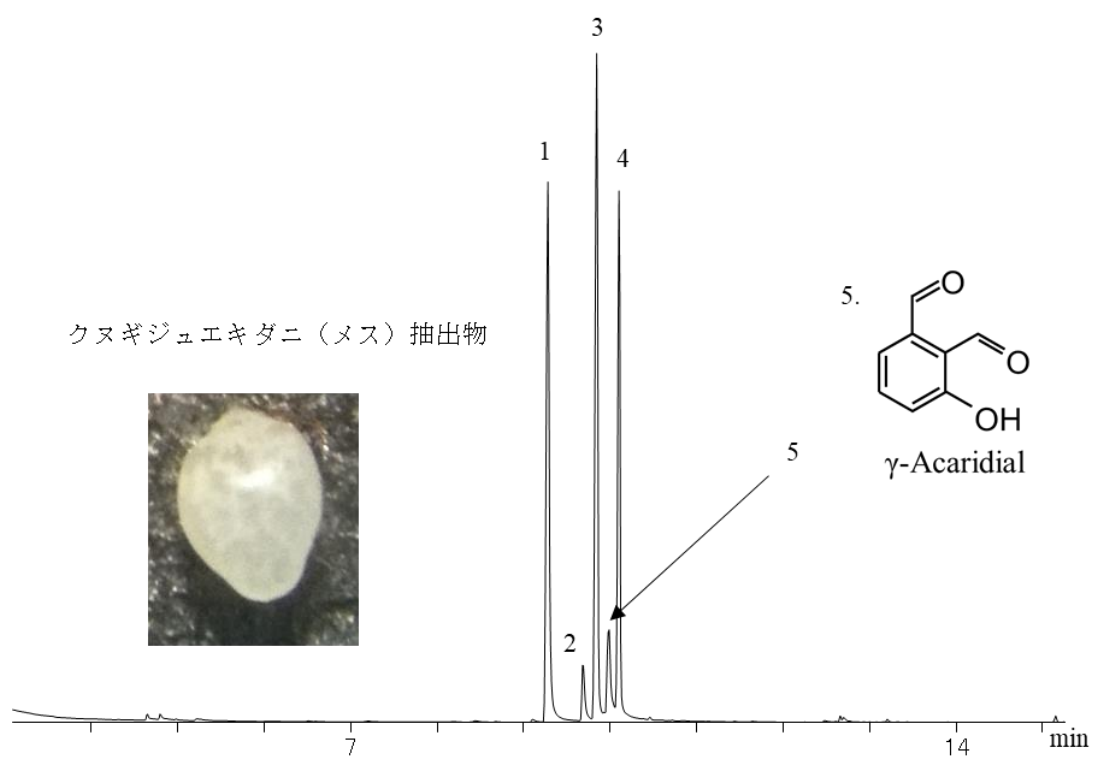
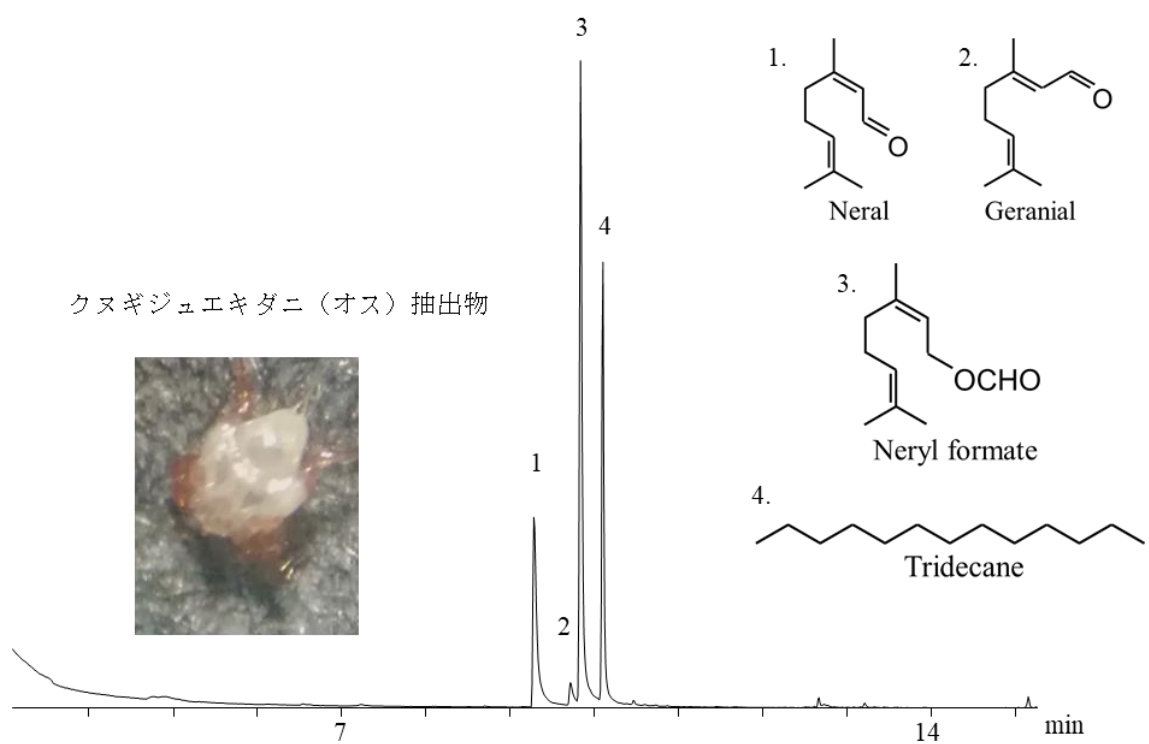


図 3-3 クヌギジュエキダニ抽出物の GC-MS 分析、オス（上）メス（下）

材料と方法

1. 試供ダニ

クヌギジュエキダニは次の方法で継代飼育した。丸く切り抜いたキムワイプをプラスチックシャーレ (9 cm × 2 cm) に入れ、キムワイプが浸るまで樹液 (果糖 2%、グルコース 1%、グリセリン 0.5%、エタノール 1%、酢酸 0.5%) を加えた。そこにダニを入れて、エサとして乾燥酵母を 1 週間に 2 回与え、20°C で飼育した。乾燥酵母の量はマイクロスパーテル 1 さじである。湿度を保つためチャック付きポリ袋に入れた。

2. クヌギジュエキダニ抽出物の定量

トレーサー実験を行うに当たって、安定して抽出物から neryl formate を分析しなければならない。クヌギジュエキダニをオスとメスに分け抽出物の定量を行った。オスとメスのそれぞれ 3 頭ずつを hexane (3 µl) で 3 分間抽出し、全量を GC-MS 分析に供した。

3. ^{13}C ラベル化アミノ酸を用いた取り込み実験

乾燥酵母に安定同位体 ^{13}C でラベル化されたアミノ酸を 25% 含むように調製し、約 2 週間クヌギジュエキダニに与え続けた。 ^{13}C ラベル化アミノ酸は serine-1- ^{13}C 、serine-3- ^{13}C 、glycine- $^{13}\text{C}_2$ を使用した (図 3-4)。その後メス 3 頭をヘキサンで抽出し、全量を GC/MS で分析した。取り込み量の定量は以下の計算式で行った。

(取り込み量 = 同位体ピークの強度 / 分子イオンピークの強度 × 100)

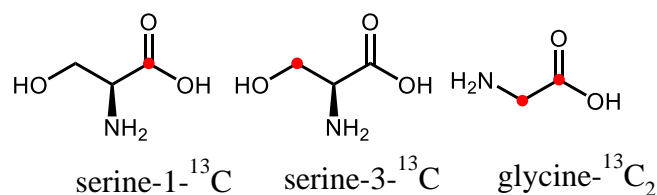


図 3-4 取り込み実験に用いた ^{13}C ラベル化アミノ酸

4. Glycerol- $^{13}\text{C}_3$ を用いた取り込み実験

乾燥酵母に Glycerol- $^{13}\text{C}_3$ を 25% 含むように調製し、第 3 章の材料と方法 2 を参照し分析した。取り込み実験は約 2 週間継続的に行った。

5. 分析条件

第 1 章の方法と材料 9 を参照した。

533 結果

534 1. クヌギジュエキダニの抽出物の定量

535 クヌギジュエキダニのオスとメスの抽出物の定量は主成分である neral、
536 geranial、neryl formate、tridecane、 γ -acaridial を対象とした。3 頭当たりの抽出
537 物の量を定量した結果、すべての成分においてメスの分泌量の方が多いことが
538 分かった（図 3-5）。オスでは geranial と γ -acaridial はほとんど見られなかつ
539 た。検出限界が原因であるのか、それともそもそもこれらの成分を分泌してい
540 ないのかは、もう少し詳細に分析を進めると判明するであろう。オスの分泌の
541 量は飼育環境に大きく影響され、環境が悪くなると分泌量が著しく減少した。
542 Neryl fomate の分析はクヌギジュエキダニのメスで行うのが適切であると判断
543 した。

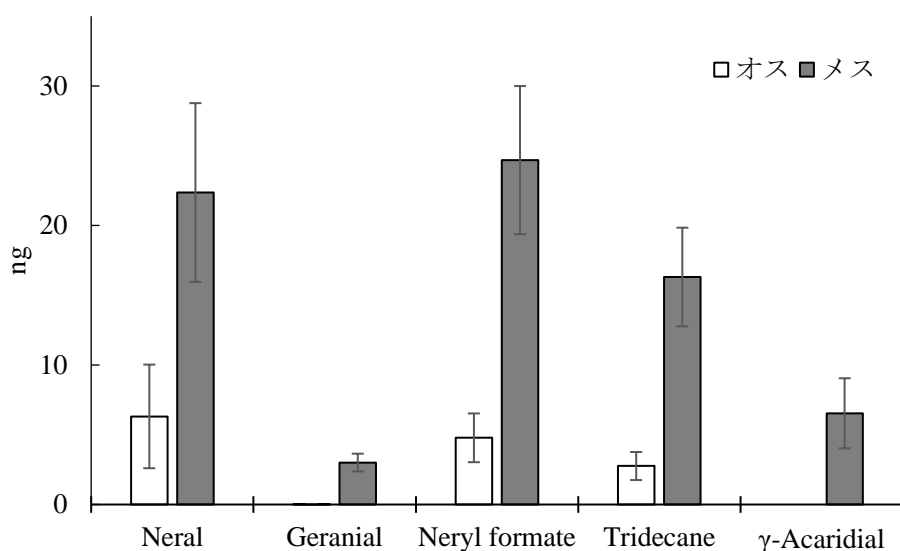


図 3-5 クヌギジュエキダニ抽出物の定量

オスとメス 3 頭分の抽出物を分析した。N = 5, \pm SE

544 2. ^{13}C ラベル化アミノ酸の取り込み実験

545 ^{13}C ラベル化アミノ酸をクヌギジュエキダニに摂食させると、通常の餌で飼
546 育していたダニでは見られなかった neryl formate の同位体ピークが、今回供試
547 したラベル化アミノ酸の全てで検出された（図 3-6）。このことから neryl
548 formate のギ酸部分は今回摂食させた serine の 1 位、serine の 3 位、glycine の炭
549 素由来であることが分かった。Glycine はアミノ酸の代謝分解の経路から 2 位の
550 炭素が導入されたことが示唆される。各 ^{13}C ラベル化アミノ酸の取り込み量は
551 serine-1- ^{13}C が 14%、serine-3- ^{13}C が 18%、glycine- $^{13}\text{C}_2$ が 14%であった（図 3-
552 7）。Serine の 1 位がギ酸炭素の由来であることはアリの先行研究とは一致しな
553 い結果となった。つまり、アリの先行研究で Serine の 1 位炭素はほとんどギ酸

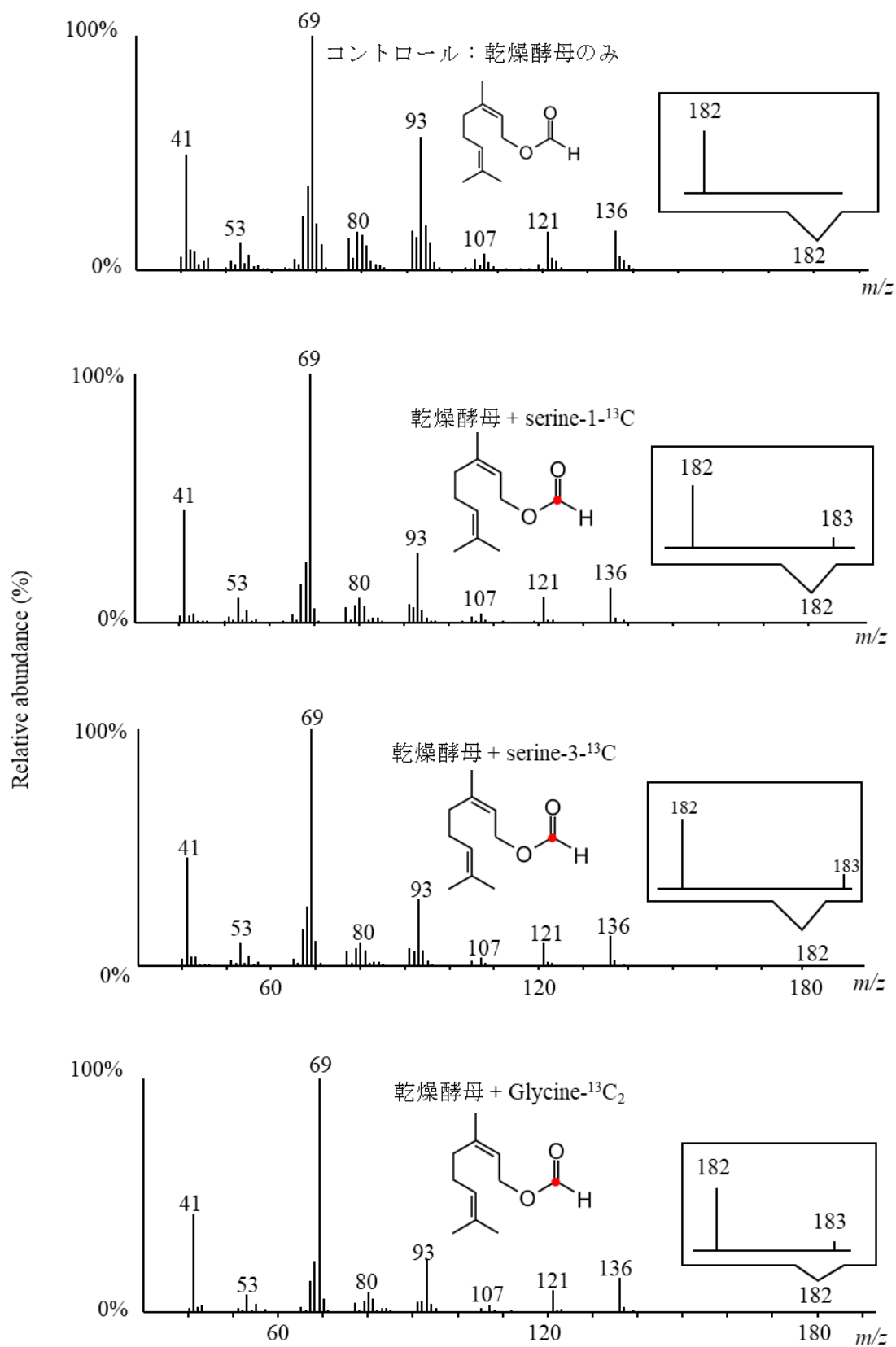


図 3-6 乾燥酵母のみと各ラベル化アミノ酸を摂食させたクヌギジュエキダニの neryl formate の GC-MS 結果

555 炭素に代謝されなかったにも関わらず、本種ダニでは neryl formate のギ酸炭素
 556 に利用される代謝経路が存在することを新たに発見した。

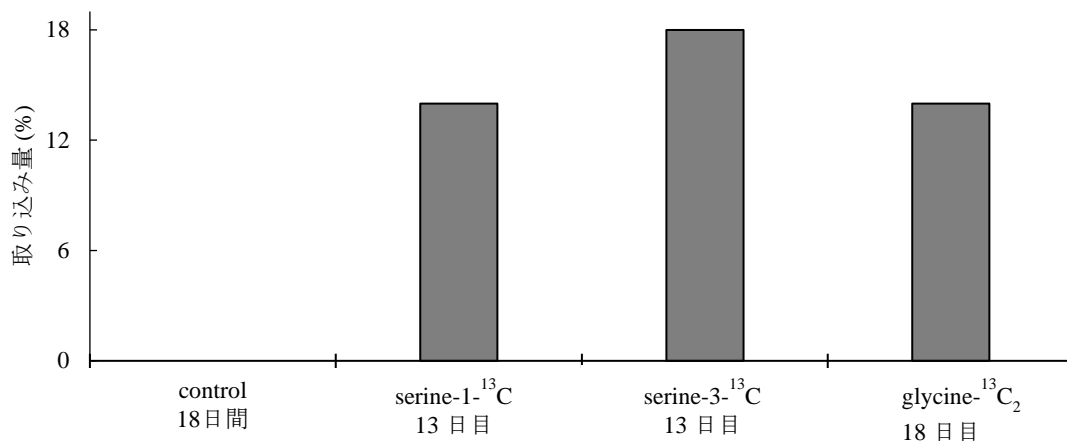


図 3-7 ¹³C ラベル化アミノ酸の取り込み量

取り込み量=同位体ピークの強度/分子イオンピークの強度×100

557 3. Glycerol-¹³C₃ の摂食実験

558 材料と方法 2 の結果から、serine-1-¹³C をクヌギジュエキダニが取り込むと、
 559 ラベル化された neryl formate が検出された。アリの先行研究で得られた結果で
 560 は、ギ酸がラベル化されなかったことから、次の代謝経路を予想した (図 3-
 561 8)。すなわち、Serine-1-¹³C が糖新生によって 3-ホスホグリセリン酸に変換され

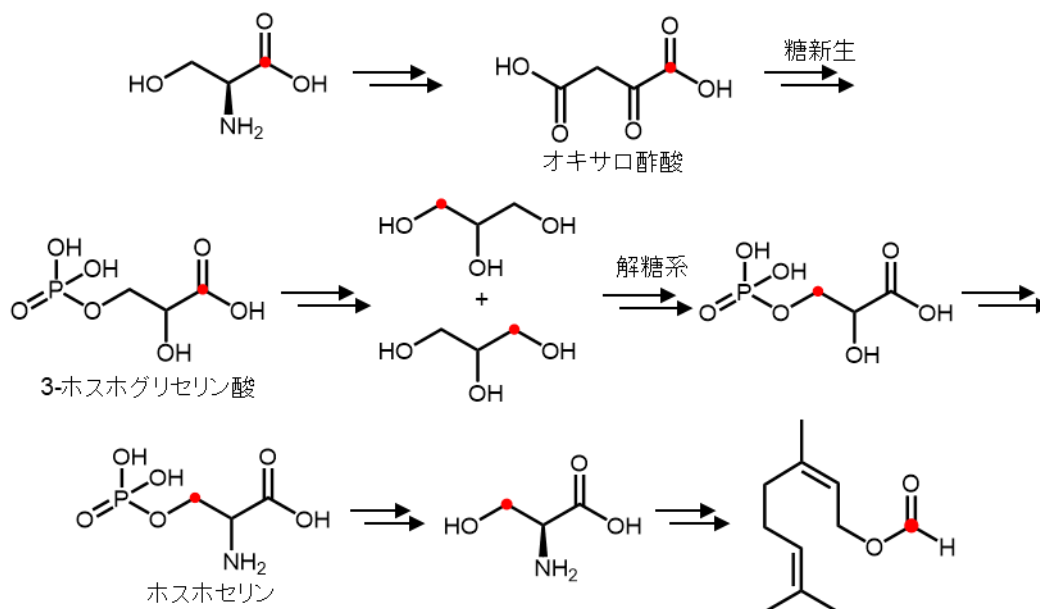


図 3-8 Serine-1-¹³C の推定代謝経路

同位体炭素は赤い点で示している。

562 るとラベル化された **glycerol** が生産される。このため 1 位と 3 位の区別がなく
563 なるため解糖系に戻って代謝されたとき、3 位がラベル化された 3-ホスホグリ
564 セリン酸が生産されることになる。このまま代謝が進むと 3 位がラベル化され
565 た **serine** が作られることでギ酸部分がラベル化された **neryl formate** が合成され
566 る。**glycerol** が実際に **neryl formate** の代謝に関わっているのか確認するため、
567 ラベル化 **glycerol** をクヌギジュエキダニに摂食させた。その結果、予想した通
568 りギ酸部分がラベル化された **neryl formate** が検出された (図 3-9)。

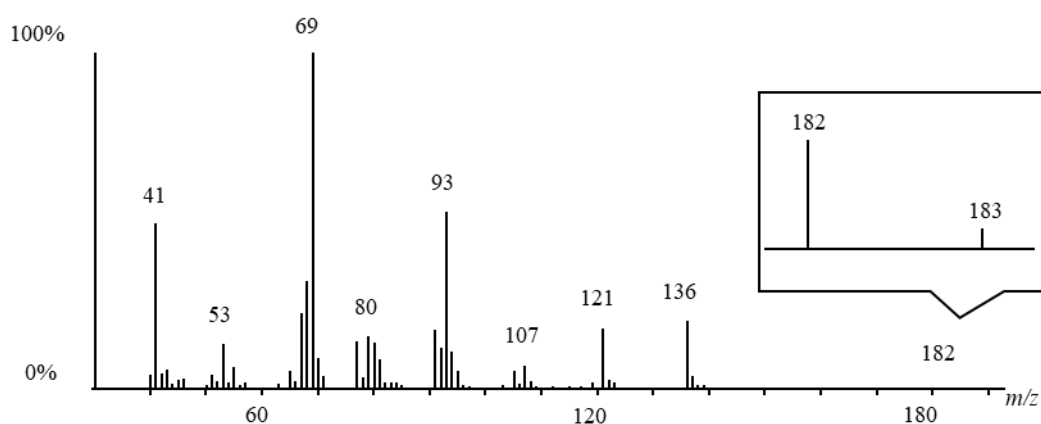


図 3-9 Glycerol- $^{13}\text{C}_3$ によってギ酸部分にラベリングされた **neryl formate**

569
570

571 考察

572 クヌギジュエキダニに serine-1-¹³C、serine-3-¹³C、glycine-¹³C₂ を摂食させた
 573 結果、ギ酸部分がラベル化された neryl formate を検出することができた。この
 574 ことから、neryl formate の生合成経路はアミノ酸の代謝によって THF にホルミ
 575 ル基が導入され、ネロールにホルミル基を輸送する経路が示唆された。しか
 576 し、serine-1-¹³C はアミノ酸の代謝だけでは説明がつかない。そこで図 3-8 のよ
 577 うな合成経路の仮説を立て、glycine-¹³C₃ による検証実験を新たに行った。その
 578 結果、neryl formate のギ酸部分がラベル化されているのを確認することができ
 579 た。すなわち、serine は糖新生を経て glycerol に代謝された後、解糖系を通って
 580 serine が再生され、且つその serine がギ酸生合成に利用されることを間接的に
 581 証明することができた。Glycerol を経由することによって元は 1 位の炭素がラ
 582 ベル化されていた serine が、再び serine が合成されたときにはラベル化位置が
 583 3 位に変化したことを本実験結果は示唆していた。

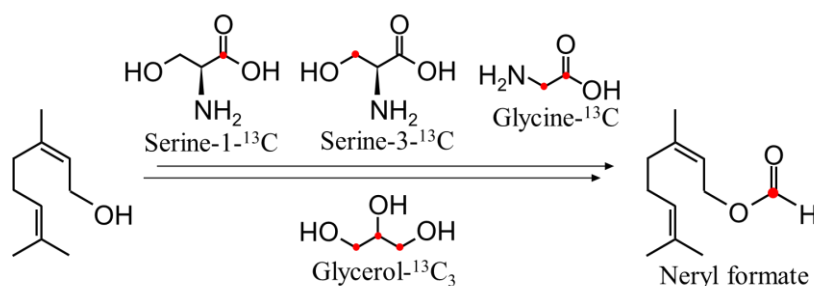


図 3-10 Neryl formate のギ酸部分の由来

584 先行研究のオオアリ属の一種 *C. pennsylvanicus* におけるギ酸の生合成研究で
 585 は、serine の 3 位炭素、glycine の 2 位炭素そして histidine の 2 位炭素がギ酸炭
 586 素に誘導された。しかし、serine の 1 位はほとんど取り込まれなかった (Hefetz
 587 *et al.*, 1978)。本種ダニは *C. pennsylvanicus* より効率的にギ酸を供給するため、
 588 生体内で合成した serine を再生して生合成に利用していると考察した。今回の
 589 研究ではホルミル THF から直接ギ酸部分が導入されているか確認することがで
 590 きなかった。より詳しく生合成経路を検証するためには、ホルミル基やメチレ
 591 ン基がラベル化された THF 誘導体を合成し neryl formate のギ酸部分がラベル化
 592 されるかどうかを確認する必要がある。また GC-MS の安定同位体ピークのみ
 593 ならず、¹³C-NMR によってギ酸部分がラベル化されているか確認する必要があ
 594 る。

595 ホルミル基の転移反応で重要な役割を果たすのが THF であり、主に生体内
 596 で必要なチミンヌクレオチド、メチオニンの合成に関わっている。ホルミル

597 THF から合成されるギ酸エステルは動物の分泌物としては初例であり、ダニ特
598 有の生合成経路が関与すると考えられる。

599 本種ダニを継続的に飼育するのは難しく、さらにアミノ酸を加えると細菌な
600 どが繁殖しやすくなる。発育条件の悪いクヌギジュエキダニの分泌量は著しく
601 低下し、十分な分析結果が得られなかった。Neryl formate の分子イオンピーク
602 はとても検出しにくいため、発育状態の良いクヌギジュエキダニを抽出しなけ
603 れば十分なマススペクトルを得るのは難しい。飼育しているキムワイプを頻繁
604 に交換するなどの工夫が必要である。オスよりもメスのほうが劣悪な環境下に
605 対して僅かながら耐性があり、分泌物を安定して検出できる。

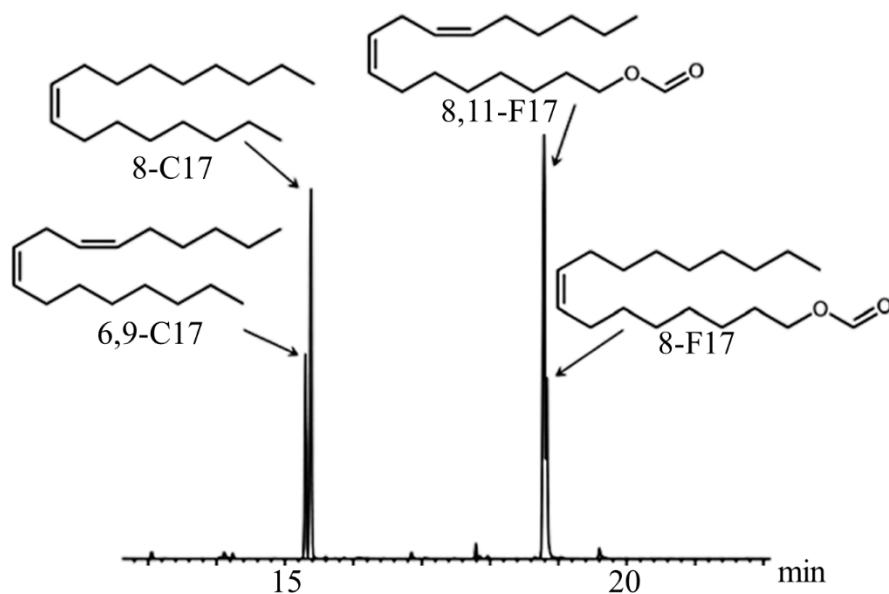
606 Glycerol を添加した乾燥酵母では 2 週間ほどで neryl formate のギ酸部分のラ
607 ベル化が確認できた。さらに glycerol -¹³C₃ を給餌すると glycerol がアセチル
608 CoA に変換され、分泌物の炭素が安定同位体に置換された。このことから
609 glycerol からの代謝経路は neryl formate のギ酸部分を優先的に供給するように
610 調節されていることが分かった。

611 総合考察

612 本研究ではコナダニ類の後胴体部腺分泌化合物に着目し、それに関わる酵素
613 と生合成経路について検討した。その過程で、コナダニ類が分泌する炭化水素
614 6,9-C17 と脂肪族ギ酸エステル 8,11-F17 の前駆体をコナダニ粗酵素液を用いて
615 証明することができた。また、安定同位体標識化合物を用いてモノテルペン
616 neryl formate のギ酸部分の生合成経路を特定することができた。本研究で得ら
617 れた結果について以下に考察する。

618
619 これまでコナダニ類に由来する分泌物の生合成経路はテルペン類と脂肪族化
620 合物に関して研究が行われてきた (Morita *et al.*, 2004, Aboshi *et al.*, 2013, Shimizu
621 *et al.*, 2014, Shimizu *et al.*, 2017)。しかし、LA から 6,9-C17 および 8,11-F17 に変
622 換する際の生合成前駆体が明らかではなかった。さらに neryl formate のギ酸部
623 分の由来もまた謎のままだった。生合成酵素まで解明されているのはサトウダ
624 ニの警報フェロモンであるネラールのみである (Kuwahara *et al.*, 1980, Noge *et*
625 *al.*, 2005, Noge *et al.*, 2008)。第 1 章では、サトウダニが分泌する 6,9-C17 の前駆
626 体は LAld であることを明らかにした。炭化水素の合成酵素は様々な生物から
627 発見されており、それらは脂肪族アルデヒドを基質としている (Neil *et al.*,
628 2013)。一方、アメリカマツノキクイムシから同定された CYP4G55 では脂肪族
629 アルデヒドに加えてアルコールも生合成に利用することが報告された
630 (MacLean *et al.*, 2018)。今回、サトウダニの 6,9-C17 生合成においては、脂肪族
631 アルデヒドである LAld が直接の生合成前駆体であることを実験的に証明し
632 た。昆虫 AD とサトウダニの炭化水素合成酵素を比較してみると、両酵素とも
633 膜タンパク質であることは共通しているが、ダニの場合は NADPH や NADH な
634 どの補酵素を要求しないことが示唆された。よって我々が同定を目指す目的酵
635 素は昆虫のものとは異なり、コナダニに特有のものであると推測している。

636 第 2 章では、ササガワダニの分泌する 8,11-F17 の前駆体が LAld であること
637 を明らかにした。さらにササガワダニで新たに見つかった酵素による Baeyer-
638 Villiger 酸化反応はこれまで動物では報告例のない反応様式を示していた。第 1
639 章と同様の手法を用いており、コナダニ類のタンパク質探索において有効な手
640 法であると考えている。サガワダニは 8,11-F17 の類縁体であるモノエン 8-F17
641 も同時に生合成して体外に分泌している。炭素数と二重結合の位置から考える
642 と 8,11-F17 はリノール酸が、8-F17 はオレイン酸が原料となって生成されてい
643 る。ササガワダニはそれらギ酸エステルに加えて、炭化水素 6,9-C17 と 8-C17
644 も分泌しており、原料となるのはそれぞれリノール酸とオレイン酸である。ダ
645 ニ分泌物の GC-MS 分析から分泌量を調べてみると、8,11-F17 と 8-F17 を比較



図IV ササガワダニ抽出物の GC-MS 分析 (Shimizu *et al.*, 2017)

すると 8,11-F17 の分泌量の方が多く、また 6,9-C17 と 8-C17 を比較すると 8-C17 の分泌量の方が多い結果が得られた (図IV) (Shimizu *et al.*, 2017)。第 1 章と第 2 章の結果から 8,11-F17 と 6,9-C17 の前駆体は共に LAld であることが証明された。これらのことを総合すると、ササガワダニは基質である LAld を優先的にギ酸エステル 8,11-F17 の合成に利用し、モノエンでは炭化水素 8-C17 を優先的に合成していることが示唆される。8,11-F17 と 8-C17 の生物活性は明らかではないが、分泌量を調節する生成機構は生物有機化学的な観点から解明すべき非常に興味深い課題と言える。

第 3 章ではクヌギジュエキダニが分泌する neryl formate のギ酸部分の生合成経路を解明した。アミノ酸の代謝から THF の炭素源供給の経路によってネロールとギ酸が縮合することが分かった。今回、検討ができなかった histidine も同様にアミノ酸分解代謝によって THF の炭素源供給の経路をたどるため、neryl formate のギ酸部分になりうると考えられる (図 3-2)。

先行研究においてコナダニ類からギ酸エステルが数多く見つかったが、生合成の観点から第 2 章で明らかにしたように、アルデヒドが基質となって一段階の Baeyer-Villiger 酸化反応で合成されるタイプと、第 3 章のようにダニ特有の生成経路で合成されたギ酸とアルコールとのエステル化反応により合成されるタイプの 2 つの分けられる。コウノホシカダニの集合フェロモン lardolure は前者のタイプと考えられる (清水, 2019)。酵素学的な諸性質を網羅的に明らかにすることによって、2 つのパターンの差別化や進化学的な経緯などが見えてくるのではないかとと思われる。

近年、害虫を選択的に駆除できる殺虫剤の研究が行なわれており、昆虫 P450 を選択的に阻害する阻害剤の研究が進められている (Feyereisen, 2014)。コナダニ類がもつ炭化水素合成酵素やギ酸エステル合成酵素、neryl formate 合成酵素の同定ができれば、酵素を阻害する物質の探索を行い、将来、農害やアレルギーを誘発することで問題になっているコナダニを選択的に駆除できる殺ダニ剤を開発できると考えている。さらにバイオテクノロジーやグリーンケミストリーの視点から、炭化水素やギ酸エステルの合成に関わる有用な酵素遺伝子が見つかれば、将来的にバイオ燃料や有用物質の工業的な製造に寄与できる可能性もある (Lin *et al.*, 2015, Leisch *et al.*, 2018)。本研究の成果を基盤として、ダニの生物有機化学的研究がさらに発展していくことを期待している。

679 謝辞

680 本研究を行う機会を与えて下さり、研究を行う上で常に的確な御助言と細や
681 かな御指導を賜りました京都先端科学大学生物有機化学研究室、清水伸泰准教
682 授に篤く御礼申し上げます。また、貴重な助言・御鞭撻を頂きました同研究
683 室、坂本文夫名誉教授、若村定男教授に深く感謝いたします。数々の御助言を
684 頂き、実験に必要な機器等を快く貸して頂きました松原守教授、實関淳准教授
685 に心からお礼申し上げます。特に御多忙にも関わらず、研究に対する姿勢や知
686 識を叩き込んでくださった事務室の森田将史様には本研究の基礎を作り上げる
687 上で、なくてはならない様々なアドバイスを頂きました。感謝の意を表しま
688 す。

689 また、研究を進める上で行き詰った際には細々とした質問に対しても丁寧に
690 答えてくださった実験事務室の菊池佑一様、様々な雑多な面倒を見て頂いた奥
691 村理絵様には、心から感謝いたします。

692 最後に、自由に研究を進めさせてくださった生物有機化学研究室の方針と環
693 境に心から感謝の意を表し、今後とも邁進してまいります。

参考文献

- Akiyama, M., T. Sakata, N. Mori, T. Kato, H. Amano, Y. Kuwahara (1997) Chemical ecology of astigmatid mites. XLVI neryl formate, the alarm pheromone of *Rhizoglyphus etosus* MANSON (Acarina: Acaridae) and the common pheromone component among four *Rhizoglyphus* mites. *Appl. Entomol. Zool.* 32 (1) 75-79.
- Belhaddad, F. S., P. Kolattukudy, (2000) Solubilization, Partial Purification, and Characterization of a Fatty Aldehyde Decarbonylase from a Higher Plant, *Pisum sativum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 377, 341-349.
- Chen, N., Y. L. Fan, Y. Bai, X. D. Li, Z. F. Zhang, T. X. Liu (2016) Cytochrome P450 gene, CYP4G51, modulates hydrocarbon production in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 76, 84-94.
- Dennis, M., P. E. Kolattukudy (1992) A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO. *PNAS.* 89, 5306-5310.
- Fashing, N. J., K. Okabe (2006) *Hericia sanukiensis*, a new species of Algophagidae (Astigmata) inhabiting sap flux in Japan. *Syst. Appl. Acarol. Spec. Publ.* 22, 1-14
- Fiorentini F., M. Geier, C. Binda, M. Winkler, K. Faber, M. Hall, A. Mattevi (2016) Biocatalytic characterization of human FMO5: Unearthing Baeyer-Villiger reactions in humans. *ACS. Chem. Biol.* 11, 1039-1048
- Ferroni, F. M., C. Tolmie, M. S. Smit, D. J. Opperman (2017) Alkyl formate ester synthesis by a fungal Baeyer-Villiger monooxygenase. *Chem. Bio. Chem.* 18, 515-517.
- Feyereisen, R. (2014) Insect P450 inhibitors and insecticides: challenges and opportunities. *Pest. Manag. Sci.* 71 (6), 793-800
- Gibbs, A. G. (1998) Water-proofing properties of cuticular lipids. *Amer. Zool.* 38, 471-482

- Hefetz, A., M. S. Blum (1978) Biosynthesis and accumulation of formic acid in the poison gland of the carpenter ant *camponotus pennsylvanicus*. *Science*. 201, 454-455.
- Hiraoka, H., N. Mori, K. Okabe, R. Nishida, Y. Kuwahara (2003) Chemical ecology of astigmatid mites LXIX. Neryl formate [3,7-dimethyl-(Z)-2,6-octadienyl formate] as the alarm pheromone of an acarid mite, *Histiogaster rotundus* Woodring (Acari: Acaridae). *Appl. Entomol. Zool.* 38 (3), 379–385.
- Howard, R. W., G. J. Blomquist (2004) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 371-393.
- Kuwahara Y., (2004) Chemical ecology of astigmatid mites. Advance in insect chemicalecology (Ring T. C., Jocelyn G. M. edited). CambrigeUniversity, Cambrige, Pp 76-109.
- Kuwahara, Y., S. Ishii, H. Fukami (1975) Neryl formate: Alarm pheromone of the cheese mite, *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina, Acaridae). *Experientia*. 31, 1115–1116.
- Kuwahara, Y., W. S. Leal, K. Kurosa, M. Sato, S. Matsuyama, T. Suzuki (1992) Chemical ecology on astigmatid mites XXXIII. Identification of (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in the secretion of *Carpoglyphus lactis* (Acarina, Carpoglyphidae) and its distribution among astigmatid mites. *J. Acarol. Soc. Jan.* 1, 95-104.
- Kuwahara, Y., H. Fukami, S. Ishii, K. Matsumoto, Y. Wada (1980a) Pheromone study on acarid mites III : Citral isolation and identification from four species of acarid mites, and its possible role. *Jap. J. Sanit. Zool.* 31, 49-52.
- Kuwahara, Y., K. Matsumoto, Y. Wada (1980b) Pheromone study on acarid mites IV : Citral : composition and function as an alarm pheromone and its secretory gland in four species of acarid mites. *Jap. J. Sanit. Zool.* 31, 73-80.

- Kuwahara, Y. Matsumoto, K. Wada, Y. Suzuki, T. (1991) Chemical ecology on astigmatid mites. XXIX. aggregation pheromone and kairomone activity of synthetic lardolure (1*R*, 3*R*, 5*R*, 7*R*)-1,3,5,7-tetramethyldecyl formate and its optical isomers to *Lardoglyphus kono*i and *Carpoglyphus lactis* (Acari: Astigmata) *Appl. Entomol. Zool.* 26, 85–89.
- Kuwahara, Y., M. Ohshima, M. Sato, K. Kurosa, S. Matsuyama, T. Suzuki (1995) Chemical ecology of astigmatid mites XL identification of the alarm pheromone and new C₁₇ hydrocarbons from *Tortonia* sp., a pest attacking the nest of *Osmia cornifrons*. *Appl. Entomol. Zool.* 30, 177-184.
- Kuwahara, Y., L. T. M. Yen, Y. Tominaga, K. Matsumoto, Y. Wada (1982) Chemical ecology on astigmatid mites. XXIX. Aggregation pheromone and kairomone activity of synthetic lardolure (1*R*,3*R*,5*R*,7*R*)-1,3,5,7-tetramethyldecyl formate and its optical isomers to *Lardoglyphus kono*i and *Carpoglyphus lactis* (Acari: Astigmata). *Agric. Biol. Chem.* 46, 2283-2291.
- Leisch, H., K. Morley, P. C. K. Lau (2011) Baeyer-Villiger monooxygenases: more than just green chemistry. *Chem. Rev.* 111, 4165-4222.
- Lin, F. M., E. N. G. Marsh, X. N. Lin (2015) Recent progress in hydrocarbon biofuel synthesis: Pathways and enzymes. *Chin. Chem. Lett.* 26, 431-434.
- MacLean, M., J. Nadeau, T. Gurnea (2018) Mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) CYP4Gs convert long and short chain alcohols and aldehydes to hydrocarbons *Insect. Biochem. Mol. Bio.* 102, 11–20.
- Marsh, E. N. G., Waugh M. W. (2013) Aldehyde decarbonylases: enigmatic enzymes of hydrocarbon biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 3, 2515-2521.
- Morita, A., N. Mori, R. Nishida, N. Hirai, Y. Kuwahara (2004) Neral (the Alarm pheromone) biosynthesis via the mevalonate pathway, evidenced by D-glucose-1-¹³C feeding in *Carpoglyphus lactis* and ¹³C incorporation into other opisthonotal gland exudates. *J. Pesttic. Sci.* 29, 27-32.

798 Noge, K., M. Kato, T. Iguchi, N. Mori, R. Nishida, Y. Kuwahara (2005) Biosynthesis of
799 neral in *Carpoglyphus lactis* (Acari: Carpoglyphidae) and detection of its key
800 enzyme, geraniol dehydrogenase, by electrophoresis. *J. Acarol. Soc. Jpn.* 14,
801 75-81.
802
803 Noge, K., M. Kato, N. Mori, M. Kataoka, C. Tanaka, Y. Yamasue, R. Nishida Y.
804 Kuwahara (2008) Geraniol dehydrogenase, the key enzyme in biosynthesis of
805 the alarm pheromone, from the astigmatid mite *Carpoglyphus lactis* (Acari:
806 Carpoglyphidae). *FEBS. J.* 275, 2807-2817.
807
808 Ozaki, M., A. Wada-Katsumata, K. Fujikawa, M. Iwasaki, F. Yokohari, Y. Satoji, T.
809 Nisimura, R. Yamaoka. (2007) Ant nestmate and non-nestmate discrimination
810 by a chemosensory sensillum. *Science.* 309, 311-314.
811
812 Qiu, Y., C. Tittiger, C. Wicker-Thomas., G. L Goff., S. Young., E. Wajnberg, T.
813 Fricaux, N. Taquet, G. J. Blomquist, R. Feyereisen (2012) An insect-specific
814 P450 oxidative decarbonylase for cuticular hydrocarbon biosynthesis. *PNAS.*
815 109, 14858-14863.
816
817 清水伸泰 (2018) ダニと昆虫の多機能フェロモンとその活用術, 昆虫と自然 :
818 特集「昆虫のフェロモン」. 北隆館, 53 (13), 4-7.
819
820 清水伸泰 (2019) ダニにおけるユニークな酵素的 Baeyer-Villiger 酸化反応、
821 「農芸化学の中での化学生態学研究ーその発展と展望」 昆虫フェロモン2 : 脂肪酸に由来するフェロモンの生合成と受容機構. 化学と生物.
822 57 (12), 749-759.
823
824
825 Shimizu, N., M. Naito, N. Mori, Y. Kuwahara (2014) De novo biosynthesis of linoleic
826 acid and its conversion to the hydrocarbon (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in the
827 astigmatid mite, *Carpoglyphus lactis*: incorporation experiments with ¹³C-
828 labeled glucose. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 45, 51-57.
829

- Shimizu, N., D. Sakata, H. Miyazaki, Y. Shimura, Y. Kuwahara (2016) Identification and synthesis of (Z,Z)-8,11-heptadecadienyl formate and (Z)-8-heptadecenyl formate: unsaturated aliphatic formates found in the unidentified astigmatid mite, *Sancassania* sp. Sasagawa (Acari: Acaridae). *Molecules*. 21 (5):619-627.
- Shimizu, N., D. Sakata, E. A. Schmelz, N. Mori, Y. Kuwahara (2017) Biosynthetic pathway of aliphatic formates via a Baeyer–Villiger oxidation in mechanism present in astigmatid mites. *PNAS*. 114, 2616-2621.
- Skelton, A. C., M. M. Cameron, J. A. Pickett, M. A. Birkett (2010) Identification of neryl formate as the airborne aggregation pheromone for the american house dust mite and the european house dust mite (Acari: Epidermoptidae). *J. Med. Entomol.* 47, 798-804.
- Tolmie, C., M. S. Smit, D. J. Opperman (2018) Native roles of Baeyer–Villiger monooxygenases in the microbial metabolism of natural compounds. *Nat. Prod. Rep.* <https://doi.org/10.1039/C8NP00054A>
- Turfitt, G. E. (1948) The microbiological degradation of steroids. *Biochem. J.* 42, 376-383.
- Yen, L. T. M., Y. Wada, K. Matsumoto, Y. Kuwahara (1980) Pheromone study on acarid mites VI Demonstration and isolation of an aggregation pheromone in *Lardoglyphus kono* Sasa et Asanuma. *Jpn. J. Sanit. Zool.* 31, 249–254.
- Yu1, Z., X. Zhang, Y. Wang, B. Moussian, K. Y. Zhu, S. Li, E. Ma1, J. Zhang (2016) LmCYP4G102: An oenocyte-specific cytochrome P450 gene required for cuticular waterproofing in the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Sci. Rep.* 6.
- Warui, D. M., Li, N., Nørgaard, H., Krebs, C., Bollinger, J. M. Jr. Booker S. J. (2011) Detection of formate, rather than carbon monoxide, as the stoichiometric coproduct in conversion of fatty aldehydes to alkanes by a cyanobacterial Aldehyde decarbonylase. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 3316-3319.